



Hemmung der Myc-Funktion durch niedermolekulare Inhibitoren der E3-Ubiquitin-Ligase Huwe1

**Inhibition of Myc function using small molecule inhibitors
of the E3 ubiquitin ligase Huwe1**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Fachrichtung Biomedizin

Vorgelegt von

Stefanie Peter

aus Dresden

Würzburg, Mai 2014

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Manfred Gessler

1. Betreuer: Prof. Dr. Martin Eilers

2. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Manfred Scharl

3. Betreuer: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

Tag des Promotionskolloquiums:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Tumorerkrankungen	3
1.2 Die Familie der Myc-Onkoproteine	3
1.2.1 Aufbau des Myc-Proteins	4
1.3 Transkriptionelle Regulation durch Myc	5
1.3.1 Aktivierung der Genexpression durch Myc	6
1.3.2 Repression der Genexpression durch Myc	8
1.4 Regulation der Myc-Funktion	9
1.4.1 Transkriptionelle Regulation der <i>MYC</i> -Expression	9
1.4.2 Regulation der mRNA-Stabilität und Translation von Myc	10
1.4.3 Post-translationelle Regulation von Myc	10
1.5 Ubiquitinierung von Proteinen	11
1.5.1 Klassifizierung der E3-Ubiquitin-Ligasen	12
1.5.2 Regulation von Myc durch E3-Ubiquitin-Ligasen	13
1.5.3 Strukturelle Eigenschaften der HECT-E3-Ubiquitin-Ligase Huwe1	15
1.5.4 Funktionen und Substratproteine von Huwe1	16
1.5.5 Modifikation von Myc durch Huwe1	18
1.6 Die Rolle von Myc und Huwe1 im Kolonkarzinom	18
1.7 Tumortheraeutische Ansätze einer Myc-Inhibition	19
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	21
2 Material	22
2.1 Bakterienstämme und Zelllinien	22
2.1.1 Bakterienstämme	22
2.1.2 Zelllinien	22
2.1.3 Primäre Zellen	23

2.2	Kultivierungsmedien und Zusätze	23
2.2.1	Medien und Antibiotika zur Bakterienkultivierung	23
2.2.2	Medien und Zusätze für die Säugerzellkultivierung	23
2.2.2.1	Medien	23
2.2.2.2	Antibiotika	24
2.2.2.3	Weitere Zusätze	24
2.3	Nukleinsäuren	25
2.3.1	Primer	25
2.3.2	Plasmide	26
2.3.3	shRNA-Sequenzen	27
2.4	Antikörper	28
2.4.1	Primärantikörper	28
2.4.2	Sekundärantikörper für Western Blot	28
2.4.3	Kontrollseren für Immunpräzipitation und Chromatin-Immunpräzipitation	29
2.5	Chemikalien	29
2.6	Standards, Enzyme und Kits	29
2.6.1	Standards	29
2.6.2	Enzyme und Kits	29
2.7	Puffer und Lösungen	30
2.8	Gebrauchsmaterialien	35
2.9	Geräte und Membranen	35
3	Methoden	38
3.1	Molekularbiologische Methoden	38
3.1.1	Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmid-amplifikation	38
3.1.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
3.1.3	Messung von Nukleinsäurekonzentrationen	39
3.1.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	39
3.1.5	Isolation von RNA	39
3.1.6	cDNA-Synthese	40

3.1.7	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	40
3.1.8	Microarray	42
3.2	Zellbiologische Methoden	42
3.2.1	Passagieren von Zellen	42
3.2.2	Auftauen von Zellen	43
3.2.3	Einfrieren von Zellen	43
3.2.4	Transfektion von Säugerzellen mit Polyethylenimin (PEI)	43
3.2.5	Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamine TM 2000	44
3.2.6	Herstellung von Retroviren in Phoenix-Zellen	44
3.2.7	Retrovirale Infektion von Säugerzellen	45
3.2.8	Herstellung von Lentiviren in HEK293T-Zellen	45
3.2.9	Lentivirale Infektion von Säugerzellen	46
3.2.10	Behandlung von Zellen mit UV-Strahlung	46
3.2.11	Wachstumskurve	46
3.2.12	BrdU-Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (BrdU-PI-FACS)	47
3.2.13	Kristallviolett-färbung	48
3.2.14	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Färbung	48
3.3	Proteinbiochemische Methoden	48
3.3.1	Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten	48
3.3.2	Fraktionierung	49
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	49
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.3.5	Western Blot	50
3.3.6	Strippen von PVDF-Membranen	51
3.3.7	Immunpräzipitation	51
3.3.8	In vivo Ubiquitinierungsuntersuchung	51
3.3.9	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	52
4	Ergebnisse	55
4.1	Validierung von Huwe1 als potentiell Zielprotein einer Tumorthherapie	55
4.1.1	Die Depletion von Huwe1 führt zum Proliferationsarrest verschiedener Kolonkarzinomzelllinien	55

4.1.2	Die induzierbare Huwe1-Depletion hemmt das Wachstum subkutaner und orthotoper Tumore	57
4.1.3	Sowohl die konstitutive als auch induzierbare Depletion von Huwe1 reprimiert Myc-aktivierte Zielgene	60
4.1.4	Die Effekte der Depletion von Huwe1 sind unabhängig von p53	63
4.2	Untersuchung und Validierung von niedermolekularen Huwe1-Inhibitoren	65
4.2.1	Die Depletion von Huwe1 hemmt die UV-induzierte Degradierung von Mcl1	65
4.2.2	Die Ubiquitinierung und UV-induzierte Degradierung von Mcl1 wird durch die Huwe1-Inhibitoren gehemmt	66
4.2.3	Die Inhibition von Huwe1 stabilisiert das Protein TopBP1	69
4.3	Analyse der Huwe1-Inhibitoren als potentielle Tumorthapeutika	70
4.3.1	Die Inhibition von Huwe1 führt zum Proliferationsarrest verschiedener Kolonkarzinomzelllinien	70
4.3.2	Die Huwe1-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Proliferation muriner embryonaler Stammzellen	75
4.3.3	Die Expression von Myc wird nicht durch die Inhibition von Huwe1 reguliert	77
4.3.4	Die Inhibition von Huwe1 reprimiert Myc-aktivierte Zielgene	78
4.3.5	Die Huwe1-Inhibitoren beeinflussen die Myc-induzierte Transaktivierung global	80
4.3.6	Die Inhibition und Depletion von Huwe1 haben identische Effekte auf die Transaktivierungsfunktion von Myc	84
4.3.7	Die Effekte der Huwe1-Inhibition sind unabhängig von p53	85
4.4	Mechanistische Analyse der Huwe1-beeinflussten Myc-Transaktivierung	87
4.4.1	Die Huwe1-induzierte Ubiquitinierung von Myc wird nicht durch Huwe1-Inhibition verringert	87
4.4.2	Huwe1 beeinflusst die Proteinmenge von Miz1	90
4.4.3	Miz1 akkumuliert am direkten Miz1-Zielgen <i>VAMP4</i> und am Myc-aktivierten E-Box-Zielgen <i>HSPE1</i> nach Huwe1-Inhibition	91
4.4.4	Die Huwe1-Inhibition beeinflusst die Histonacetylierung am <i>HSPE1</i> -Promoter	93
4.4.5	Die Depletion von Huwe1 induziert eine Deacetylierung von Histon H3 am <i>HSPE1</i> -Promoter	95

4.4.6	Die Expression direkter Miz1-Zielgene wird nicht durch Huwe1 reguliert	96
5	Diskussion	98
5.1	Die Rolle von Huwe1 in der Karzinogenese - Onkoprotein oder Tumorsuppressor?	98
5.1.1	Das Wachstum subkutaner und orthotoper Tumore der Kolonkarzinomzelllinie Ls174T ist abhängig von Huwe1	99
5.2	Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems	100
5.3	Ein <i>in vitro</i> Auto-Ubiquitinierungsassay führte zur Identifikation von spezifischen niedermolekularen Huwe1-Inhibitoren	101
5.4	Die Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 sind potentielle Tumorthapeutika im Kolonkarzinom	103
5.4.1	Huwe1 wird für die Proliferation von Kolonkarzinomzelllinien benötigt	103
5.4.2	Huwe1 hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von Myc, aber reguliert die Transaktivierung von Myc-Zielgenen	105
5.4.3	Die Inaktivierung von Huwe1 reprimiert die Myc-Transaktivierung unabhängig von p53	107
5.4.4	Die Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 verzögern den Abbau von N-Myc, haben aber keinen Einfluss auf die Proliferation embryonaler Stammzellen	108
5.5	Huwe1 beeinflusst die Aktivität von Myc über die Regulation des Gleichgewichts zwischen aktiven und repressiven Myc/Miz1-Komplexen	109
5.5.1	Die Ubiquitinierung von Myc vermittelt nicht ausschließlich die durch Huwe1-Inaktivierung verursachte Repression von Myc-Zielgenen	110
5.5.2	Die Inaktivierung von Huwe1 führt nicht zur Akkumulation von Hdac2	110
5.5.3	Die Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 induzieren die Bildung eines repressiven Myc/Miz1-Komplexes am Myc-aktivierten Zielgen <i>HSPE1</i>	111
5.5.4	Die Inaktivierung von Huwe1 führt zur Akkumulation von Miz1 am direkten Miz1-Zielgen <i>VAMP4</i> , reguliert aber nicht die Expression	113
5.5.5	Modell der Huwe1-regulierten Transaktivierung von Myc-Zielgenen	114
6	Literaturverzeichnis	116
7	Anhang	136

Inhaltsverzeichnis

7.1	Abkürzungsverzeichnis	136
7.2	Publikationen	143
7.3	Danksagung	144
7.4	Eidesstattliche Erklärung	145
7.5	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Zusammenfassung

Die Deregulation des Transkriptionsfaktors Myc ist ein zentraler Mechanismus in der kolorektalen Karzinogenese. Die Myc-Deletion in Tumormodellen hemmt das Wachstum von Kolonkarzinomen, somit stellt die Inaktivierung von Myc einen Ansatzpunkt in der Behandlung von kolorektalen Tumoren dar. Die direkte Inhibition von Myc ist schwierig, da Myc keine katalytische Aktivität besitzt und stattdessen für die Myc-Funktion nötige Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen angegriffen werden müssen. Die E3-Ubiquitin-Ligase Huwe1 interagiert sowohl mit Myc als auch mit dem Myc-interagierenden Protein Miz1 und ist im Kolonkarzinom überexprimiert. Huwe1 ubiquitiniert Myc und induziert darüber dessen Transaktivierungsfunktion. Die Inaktivierung von Huwe1 ist somit eine vielversprechende Möglichkeit für die Inhibition der Myc-Funktion und die Therapie des Kolonkarzinoms.

In dieser Arbeit wird mittels shRNA-vermittelter Depletion von Huwe1 in Zellkulturexperimenten gezeigt, dass Huwe1 für die Proliferation von Kolonkarzinomzelllinien und für die Transaktivierung von Myc-Zielgenen benötigt wird. Mit zwei von Boehringer Ingelheim identifizierten niedermolekularen Huwe1-Inhibitoren (BI8622 und BI8626) ist es möglich, die Huwe1-Funktion spezifisch in Zellen zu blockieren. Die Huwe1-Inhibitoren induzieren einen Proliferationsarrest in kolorektalen Karzinomzelllinien, wohingegen die Substanzen auf embryonale Stammzellen keine Auswirkungen haben. Die Inaktivierung von Huwe1 führt zu einer Akkumulation von Miz1 an Promotoren Myc-aktivierter Zielgene und darüber zu einer vermehrten Bildung repressiver Myc/Miz1-Komplexe, was mit einer Deacetylierung von Histon H3 und einer transkriptionellen Repression Myc-gebundener Gene assoziiert ist. Miz1 akkumuliert nach Huwe1-Inhibition ebenso an direkten Miz1-Zielgenen, deren Expression bleibt aber unbeeinflusst. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine kontinuierliche Degradierung von Miz1 durch Huwe1 zur Transaktivierung von Myc-Zielgenen in Kolonkarzinomzellen nötig ist. Damit wurde ein neuer Mechanismus identifiziert, über den Huwe1 die Myc-Transaktivierung reguliert und der eine tumorzellspezifische Repression der Myc-Funktion mit Hilfe von Huwe1-Inhibitoren ermöglicht.

Summary

Deregulation of the transcription factor Myc is a central driver in colorectal carcinogenesis. Deletion of Myc in murine tumor models inhibits the growth of colon carcinoma, therefore inactivation of Myc is an attractive possibility for treating these types of malignancies. Since Myc does not contain any catalytic activity, protein-protein or protein-DNA interactions necessary for Myc function need to be modified, making direct targeting of Myc difficult. The E3 ubiquitin ligase Huwe1 interacts both with Myc and the Myc-interacting protein Miz1 and is overexpressed in colorectal cancer. Huwe1 ubiquitinates Myc thereby inducing its transactivation function. Hence, inactivation of Huwe1 is a reasonable approach for inhibition of Myc function and treatment of colon cancer.

In this work depletion of Huwe1 via shRNA shows that Huwe1 is required for the proliferation of colon carcinoma cell lines and for transactivation of Myc target genes. Two novel small molecule inhibitors of Huwe1 (BI8622 and BI8626), which were identified by Boehringer Ingelheim, block Huwe1 function in cells specifically. The Huwe1 inhibitors induce a proliferation arrest in colorectal cancer cell lines, but not in embryonic stem cells. Inactivation of Huwe1 leads to an accumulation of Miz1 at promoters of Myc-activated target genes and to an increased formation of repressive Myc/Miz1 complexes at these sites. This is associated with deacetylation of histone H3 and transcriptional repression of Myc-bound genes. Additionally, Miz1 accumulates at direct Miz1 target genes upon Huwe1 inhibition but this does not influence expression of these genes. These data suggest that a continuous degradation of Miz1 by Huwe1 is required for transcriptional activation of Myc target genes in colon cancer cells. This identified a new principle how Huwe1 regulates Myc transactivation allowing a tumor cell-specific repression of Myc function via small molecule inhibitors of Huwe1.

1 Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen

Zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase unterliegen Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Metabolismus und Differenzierung in gesunden Zellen einer strikten Kontrolle durch eine Vielzahl an Signalwegen. Bei der Tumorgenese kommt es zu einer Deregulation dieser Kontrollmechanismen, die u. a. zu einer uneingeschränkten Vermehrung der Tumorzellen führt. Auslöser sind zumeist Veränderungen in der DNA-Sequenz von Genen (z. B. durch Mutationen, Translokationen, Amplifikationen), die zwei unterschiedliche Klassen von Proteinen kodieren: Proto-Onkoproteine und Tumorsuppressorproteine. Proto-Onkoproteine sind zum einen an der Stimulation des Zellzyklus beteiligt, zum anderen können sie anti-apoptotische Funktionen besitzen. Die Deregulation dieser Proteine führt z. B. zur erhöhten Expression oder verstärkten Aktivierung, sodass sie als Onkoproteine die Karzinogenese fördern. Tumorsuppressorproteine sind dagegen in der Lage, die Proliferation von Zellen zu hemmen oder Apoptose auszulösen. Ihre Inaktivierung oder verminderte Expression trägt somit zur Tumorentstehung bei. Dabei wird allgemein angenommen, dass eine einzige Mutation nicht genügt, um Krebs auszulösen, da gegensätzliche regulatorische Mechanismen dies kompensieren können. Vielmehr müssen während der Karzinogenese mindestens zwei Proteine in ihrer Funktion oder Expression verändert sein, sodass das Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zelltod gestört ist (*multiple hit hypothesis*) (Knudson, 1971).

1.2 Die Familie der Myc-Onkoproteine

Mit der Beobachtung, dass das humane *MYC*-Gen im Burkitt-Lymphom durch eine Translokation verändert ist, wurde *MYC* erstmalig als *bona fide* Onkogen identifiziert (Dalla-Favera et al, 1982; Taub et al, 1982). Heute ist bekannt, dass das Protein c-Myc (*cellular homologue of the oncogene v-Myc*, im weiteren Verlauf der Arbeit als Myc bezeichnet) in einem Großteil humaner Tumore dereguliert ist (Übersicht in (Vita & Henriksson, 2006)). Dies kann durch Translokationen, Amplifikationen und Veränderungen in der Regulation der Proteinstabilität ausgelöst werden, was in einer erhöhten Expression von Myc resultiert (Übersicht in (Meyer & Penn, 2008)).

Myc ist ein evolutionär hochkonserviertes Protein, zu dessen Familie im Menschen auch N-Myc und L-Myc gehören. Das L-Myc kodierende Gen *MYCL* wurde als erstes in einer Zelllinie des kleinzelligen Lungenkarzinoms identifiziert, in der eine Amplifikation des Gens vorliegt (Nau et al, 1985). Über die *in vivo* Funktionen ist wenig bekannt, aber vor kurzem wurde herausgefunden, dass L-Myc in reifen dendritischen Zellen exprimiert wird und eine Rolle bei der T-Zell-Aktivierung spielt (Kc et al, 2014). *MYCN*, welches das N-Myc-Protein kodiert, wurde als amplifiziertes Gen sowohl in Neuroblastomzelllinien als auch in Neuroblastomtumoren entdeckt (Brodeur et al, 1984; Kohl et al, 1983; Schwab et al, 1983; Schwab et al, 1984). N-Myc wird nur in bestimmten Geweben, v. a. während der Embryogenese, exprimiert und ist essentiell für die Entwicklung (Jakobovits et al, 1985; Zimmerman et al, 1986).

1.2.1 Aufbau des Myc-Proteins

Myc ist ein Transkriptionsfaktor und gehört zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Proteine (bHLH-LZ). Es ist aus mehreren funktionellen Domänen aufgebaut, denen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden können (Abb. 1.1) (Übersicht in (Conacci-Sorrell et al, 2014)). Am N-Terminus befindet sich eine weitgehend unstrukturierte Region, welche sowohl Myc-Box I als auch Myc-Box II enthält, die wiederum essentiell für die Regulation der Transkription durch Myc sind. Myc-Boxen sind Domänen, die zwischen Myc, N-Myc und L-Myc hochkonserviert sind. Beide Myc-Boxen sind notwendig für die zelltransformierenden Eigenschaften von Myc (Stone et al, 1987). Zusätzlich wird die Myc-Box I durch die Phosphorylierungsstellen Threonin 58 (Thr58) und Serin 62 (Ser62) charakterisiert, die an der Regulation der Proteinstabilität von Myc beteiligt sind (Sears et al, 2000). Die Relevanz von Myc-Box I in der Tumorbilogie wird durch verschiedene Tumormodelle belegt, in denen Mutationen in der Myc-Box I das onkogene Potential von Myc erhöhen (Hemann et al, 2005; Wang et al, 2011). Über die Myc-Box II können eine Reihe von Interaktionspartner rekrutiert werden, die als Kofaktoren für die Transaktivierung und Transrepression durch Myc dienen. Dazu gehören u.a. das Adapterprotein Ttrap oder auch die ATPasen Tip48 und Tip49 (McMahon et al, 1998; Wood et al, 2000). Ein mittleres Segment ist gekennzeichnet durch eine Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reiche Region (PEST), die für die Degradierung von Myc notwendig ist (Gregory & Hann, 2000). Die Myc-Boxen III und IV regulieren ebenfalls die transkriptionelle Aktivität von Myc sowie die Myc-induzierte

Apoptose (Cowling et al, 2006; Herbst et al, 2005). Ein Kernlokalisationssignal (NLS) überlappt teilweise mit der Myc-Box IV (Dang & Lee, 1988). Im C-Terminus des Myc-Proteins befindet sich eine basische Region (BR) und die HLH-LZ-Domäne, welche die sequenz-spezifische DNA-Bindung von Myc und die Interaktion mit verschiedenen Proteinen vermitteln. So ermöglicht die HLH-LZ-Domäne die zur Transaktivierung und Zelltransformation essentielle Heterodimerisierung mit dem Partnerprotein Max (*Myc-associated factor X*) (Amati et al, 1993; Blackwood & Eisenman, 1991; Blackwood et al, 1992). Die Myc/Max-Dimere binden an spezifische DNA-Regionen, die kanonischen (CACGTG) oder nicht-kanonischen (CANNTG) E-Box-Sequenzen, und regulieren die Transkription der jeweiligen Zielgene (Blackwell et al, 1993; Blackwell et al, 1990; Prendergast & Ziff, 1991). Des Weiteren werden über die HLH-LZ-Region Interaktionen mit anderen Proteinen wie dem Zinkfingerprotein Miz1 (*Myc-interacting zinc finger 1*) und den Histonacetyltransferasen CBP sowie p300 vermittelt (Peukert et al, 1997; Vervoorts et al, 2003).



Abb. 1.1 Struktur des Myc-Proteins

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von humanem Myc. Das Protein ist aus 439 Aminosäuren aufgebaut und besitzt eine N-terminale Region (grau), eine zentrale Prolin-, Glutamat-, Serin-, Threonin-reiche Sequenz (PEST, rot), sowie vier Myc-Boxen (I-IV, gelb). Ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS, rot) überlappt mit Myc-Box IV. Der C-Terminus enthält eine basische Region (BR, grün) und den Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper (HLH-LZ, blau). Modifiziert von (Conacci-Sorrell et al, 2014).

1.3 Transkriptionelle Regulation durch Myc

Als Transkriptionsfaktor ist Myc an der Regulation der Genexpression beteiligt. Dabei bindet Myc an tausende Promotoren im Genom von Säugerzellen (Guccione et al, 2006; Lin et al, 2012; Nie et al, 2012; Walz et al, 2014). Einerseits ist Myc in der Lage, die Transkription spezifischer Zielgene zu aktivieren oder zu reprimieren, was auf Ebene der Transkriptionsinitiation geschehen kann. In Tumorzellen mit hohen Myc-Proteinmengen können z. B. an der Zell-Adhäsion, Angiogenese oder Apoptose beteiligte Gene zelltyp-spezifisch transkriptionell reguliert werden (Walz et al, 2014). Dies resultiert in einem für den

jeweiligen Zelltyp individuellen Genexpressionsmuster, einer sogenannten „Myc-Signatur“ (Übersicht in (Rahl & Young, 2014)). Wie gezeigt werden konnte, wird die transkriptionelle Aktivierung einerseits genomweit durch eine Steigerung der Initiationsrate der RNA-Polymerase II erreicht (Walz et al, 2014). Zum anderen wird die Expression vieler Gene auf Ebene der Elongation reguliert, wobei die RNA-Polymerase II nach der Initiation nahe am Promoter pausiert (*promoter-proximal pausing*). Dies kann durch den positiven Elongationsfaktor P-Tefb aufgehoben werden (Marshall & Price, 1992). Sowohl in embryonalen Stammzellen als auch in Tumorzellen kann Myc durch Rekrutierung von P-Tefb die Elongation induzieren (Lin et al, 2012; Rahl et al, 2010). Darüber kann Myc im Gegensatz zur eingangs erläuterten Aktivierung spezifischer Zielgene die Expression aller aktiven Gene in Tumorzellen generell amplifizieren. Außerdem wurde in aktivierten B- und T-Lymphozyten in genomweiten Studien nachgewiesen, dass eine Zunahme der Myc-Bindung an Promotoren in einer vermehrten Rekrutierung der RNA-Polymerase II resultiert (Nie et al, 2012). Durch die Aktivierung von Myc kommt es nachfolgend zu einer verstärkten Elongation durch die Freisetzung pausierter RNA-Polymerase II. Dies korreliert wiederum mit einer Induktion der Transkription aller Gene. Welche der beiden beschriebenen Funktionen Myc übernimmt - die spezifische Transaktivierung direkter Zielgene oder eine generelle Amplifikation der Genexpression - hängt von verschiedenen Faktoren ab. Sowohl die vorhandene Myc-Proteinmenge als auch mit Myc interagierende Proteine wie z. B. der Transkriptionsfaktor Miz1 beeinflussen diese Aktivitäten (Walz et al, 2014).

Im Folgenden sollen die Mechanismen der transkriptionellen Aktivierung und Repression durch Myc und die damit verbundenen physiologischen Funktionen näher erläutert werden.

1.3.1 Aktivierung der Genexpression durch Myc

Zur Myc-vermittelten Initiation der Transkription von Zielgenen ist die Heterodimerisierung mit Max und die Bindung an spezifische E-Box-Sequenzen essentiell (s. Abschnitt 1.2.1). Durch die direkte Interaktion mit verschiedenen Kofaktoren kann im nächsten Schritt die Genexpression induziert werden (Abb. 1.2). Einer dieser Kofaktoren ist Trrap, der eine Untereinheit des STAGA-Koaktivator-Komplexes darstellt und worüber Myc die im Komplex enthaltene Histonacetyltransferase (HAT) Gcn5 an die Zielpromotoren rekrutiert (McMahon et al, 1998; McMahon et al, 2000). Eine weitere Histonacetyltransferase, die

durch Interaktion mit Trrap rekrutiert wird, ist Tip60 als Teil des Tip60-Koaktivator-Komplexes (Frank et al, 2003). Durch die beschriebenen HAT-Aktivitäten werden präferentiell die Histone H3 und H4 acetyliert, was zu einer leichter zugänglichen Chromatinstruktur führt (Bouchard et al, 2001; Eberhardy et al, 2000). Der Tip60-Komplex beinhaltet zusätzlich die Proteine Tip48 und Tip49, die auch unabhängig von Trrap an Myc binden können und ATPase-Aktivität z. B. als Untereinheiten von Chromatin-Remodelling-Komplexen besitzen (Wood et al, 2000). Sowohl CBP als auch p300 interagieren mit dem C-Terminus von Myc und besitzen ebenfalls HAT-Aktivität (Vervoorts et al, 2003). Über N-terminale Interaktionen rekrutiert Myc nicht nur den Mediator-Komplex sondern auch die Untereinheiten Cdk9 und Cyclin T1 von P-Tefb (Bouchard et al, 2004; Eberhardy & Farnham, 2001; Kanazawa et al, 2003), dessen Funktion bereits im vorangegangenen Abschnitt erläutert wurde.

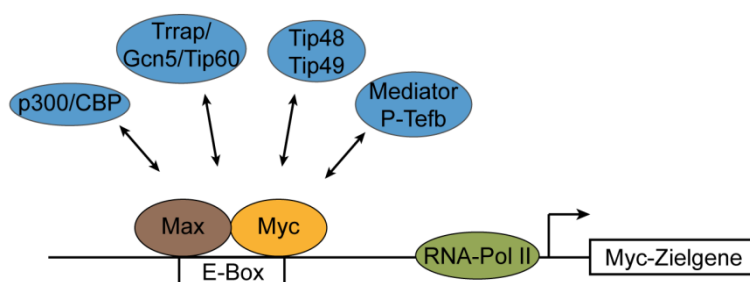


Abb. 1.2 Transaktivierung von Zielgenen durch Myc

Schematische Darstellung der Myc-induzierten Transkription von Zielgenen. Myc bindet als Heterodimer mit Max an E-Box-Sequenzen der DNA (CANNTG) und interagiert mit verschiedenen Kofaktoren. Diese tragen zum einen zum Umbau der Chromatinstruktur bei und regulieren zum anderen direkt die Aktivität der RNA-Polymerase II (RNA-Pol II).

Über die Transaktivierung von Myc-Zielgenen wird eine Vielzahl von zellulären Prozessen gesteuert wie Proliferation, Ribosomenbiogenese und Proteinsynthese, Metabolismus, Apoptose und Differenzierung. Hier soll anhand von einigen Beispielen ein kurzer Einblick in die Rolle von Myc dabei gegeben werden.

Die Stimulation der Proliferation, insbesondere des G1/S-Übergangs, durch Myc erfolgt meist abhängig von Proliferationssignalen wie Wachstumsfaktoren. Zu den beteiligten Genen, die durch Myc aktiviert werden, gehören u. a. verschiedene Cyclin-kodierende Gene (darunter

CCND2) und *CDK4* (Bouchard et al, 2001; Hermeking et al, 2000). Zusätzlich wird eine Reihe von metabolischen Signalwegen durch Myc gesteuert. Einer der wichtigsten Stoffwechselwege, die Glykolyse, wird durch Induktion mehrerer darin involvierter Gene wie *LDHA*, *GLUT1*, *PFK* und *GAPDH* gefördert (Osthus et al, 2000; Shim et al, 1997). Des Weiteren begünstigt Myc auch die Nukleotidsynthese über die Transaktivierung von Genen wie *CAD* und *ODC1* (Bello-Fernandez et al, 1993; Miltenberger et al, 1995).

Neben der Aktivität der RNA-Polymerase II steuert Myc auch die RNA-Polymerase I- und III-vermittelte Transkription und ist darüber an der Regulation der Proteinsynthese und des Zellwachstums beteiligt. Myc induziert die Transkription von rDNA durch die RNA-Polymerase I und ist zusätzlich an der rRNA-Prozessierung beteiligt (Arabi et al, 2005; Grandori et al, 2005; Schlosser et al, 2003). Auch die Expression von Genen, die für ribosomale Proteine kodieren, wird durch Myc aktiviert (Fernandez et al, 2003). Neben RNA-Polymerase I-Genen reguliert Myc die tRNA- und 5S rRNA-Gene, die durch die RNA-Polymerase III transkribiert werden und für eine effektive Proteinsynthese essentiell sind (Gomez-Roman et al, 2003).

1.3.2 Repression der Genexpression durch Myc

Myc besitzt nicht nur eine Transaktivierungsfunktion, sondern ist auch in der Lage, die Transkription von Genen zu reprimieren. Für das reprimierte Gen *CDKN1B* (p27Kip1) konnte eine direkte Bindung von Myc an den Kernpromoter gezeigt werden (Yang et al, 2001). Unabhängig von Partnerproteinen kann Myc über die Myc-Box III auch die Histondeacetylase Hdac3 rekrutieren (Kurland & Tansey, 2008). Dies hat eine verminderte Acetylierung der Histone H3 und H4 zur Folge und führt zur Repression der Gene *ID2* und *GADD153*.

Weitere Studien belegen, dass Myc hauptsächlich über andere Proteine wie z. B. NF-Y, TFII-I, YY-I und Sp1 an spezifische Promoterregionen rekrutiert wird, um die Expression der jeweiligen Gene zu inhibieren (Gartel et al, 2001; Izumi et al, 2001; Roy et al, 1993; Shrivastava et al, 1993). Eines der am besten charakterisierten Beispiele dieses Mechanismus ist die Myc-abhängige Repression der Transaktivierung durch Miz1. Miz1 ist ein Mitglied der BTB/POZ (*bric-à-brac*, *tramtrack* and *broad complex/poxvirus and zinc finger*)-Familie von Transkriptionsfaktoren und wurde erstmalig als Interaktionspartner von Myc beschrieben (Peukert et al, 1997). Durch die Assoziation mit Myc über die Zinkfingerregion von Miz1

kann Myc (im Komplex mit Max) u. a. an die Promotoren der Zellzyklusinhibitor-Gene *CDKN2B* (p15Ink4b) und *CDKN1A* (p21Cip1) rekrutiert werden, was eine Repression der Miz1-induzierten Transkription zur Folge hat (Herold et al, 2002; Seoane et al, 2002; Seoane et al, 2001; Staller et al, 2001; Wu et al, 2003). Dies geschieht zum einen über die Kompetition von Myc mit p300 um die Bindung an Miz1 (Staller et al, 2001). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Myc und die Histonmethyltransferase Dnmt3a einen ternären Komplex mit Miz1 am *CDKN1A*-Promoter bilden, was ebenfalls zur Deaktivierung der Expression beiträgt (Brenner et al, 2005). Der Einfluss von Myc auf die Transaktivierung von Miz1 wird durch eine Punktmutante, MycV394D, bestätigt, die nicht an Miz1 binden kann und deren repressiver Effekt abgeschwächt ist (Herold et al, 2002). Neuere genomweite Daten belegen zudem, dass Myc und Miz1 im Komplex an eine Vielzahl von Promotoren binden und je nach Myc/Miz1-Verhältnis die Transkription aktivieren oder inhibieren können (Walz et al, 2014). Myc-induzierte Gene weisen somit ein hohes Myc/Miz1-Verhältnis auf, wohingegen dies an reprimierten Genen verringert ist.

1.4 Regulation der Myc-Funktion

Da Myc eine große Anzahl an zellulären Prozessen steuert (s. Abschnitt 1.3), muss die Expression und Funktion von Myc präzise kontrolliert werden, um eine physiologische Zellfunktion aufrechtzuerhalten. Daher erfolgt die Regulation von Myc auf vielen verschiedenen Ebenen: transkriptionell, post-transkriptionell durch Regulation der mRNA-Stabilität, translationell und auch post-translationell (Übersicht in (Meyer & Penn, 2008)).

1.4.1 Transkriptionelle Regulation der MYC-Expression

Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren ist bekannt, welche die Transkription von *MYC* induzieren können (Übersicht in (Levens, 2010)). So ist Myc z. B. mit dem Wnt-Signalweg assoziiert, indem der Wnt-regulierte Transkriptionsfaktor Tcf die Expression von *MYC* direkt induziert (He et al, 1998). Für ein Mitglied der E2F-Familie von Transkriptionsfaktoren, E2F1, und den Transkriptionsfaktor Ets wurde zudem nachgewiesen, dass beide Proteine dieselbe Bindestelle im *MYC*-Promoter verwenden und die Transkription von *MYC* induzieren (Roussel et al, 1994). Weitere Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktoren sind andererseits in

der Lage, die Expression von *MYC* zu reprimieren: Nach TGF- β -Stimulation wird ein repressiver Komplex aus Smad-Proteinen sowie E2F4 und E2F5 gebildet, der an spezifische Smad/E2F-Bindestellen im Promoter des *MYC*-Gens bindet (Chen et al, 2002). Des Weiteren kann die Transkription von *MYC* durch Veränderungen in der Chromatinstruktur, z. B. durch Histonacetylierungen, reguliert werden. Es wurde gezeigt, dass das Bromodomänen-Protein Brd4, das an acetylierte Histone bindet und über die Rekrutierung weiterer Koaktivatoren die Transkription begünstigt, die Expression von *MYC* aktiviert (Delmore et al, 2011; Mertz et al, 2011).

1.4.2 Regulation der mRNA-Stabilität und Translation von Myc

Neben der sehr kurzen Halbwertszeit der *MYC*-mRNA von 20 bis 30 Minuten (Brewer & Ross, 1988; Dani et al, 1984) wird auch deren Translation durch verschiedene Prozesse reguliert. In der 5'UTR von *MYC* ist eine IRES-Sequenz (*internal ribosomal entry site*) zu finden, an die Ribosomen unabhängig von der 5'-Kappe der mRNA rekrutiert werden und darüber die Translation initiieren (Stoneley et al, 1998). In den letzten Jahren wurde darüber hinaus die 3'UTR-abhängige Regulation der *MYC*-Translation durch verschiedene microRNAs (miRNAs) beschrieben, die entweder die Translation inhibieren oder zur Degradierung der mRNA führen: miR-34 (Cannell et al, 2010; Kress et al, 2011), miR-145 (Sachdeva et al, 2009) und let-7 (Akao et al, 2006; Sampson et al, 2007). So wird z. B. über die Phosphorylierung von FoxO3a durch die Kinase MK5 die Expression der miRNAs miR34b und miR34c induziert, die wiederum die Translation von Myc inhibieren (Kress et al, 2011). Dies ist gleichzeitig Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus, da Myc die Expression von MK5 direkt aktiviert.

1.4.3 Post-translationelle Regulation von Myc

Das Myc-Protein unterliegt einer Vielzahl von post-translationellen Modifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung, die sowohl die Stabilität als auch die Funktion von Myc beeinflussen können (Übersicht in (Vervoorts et al, 2006)). Zum einen ist Myc ein Zielprotein für die Acetylierung durch verschiedene Histonacetyltransferasen, darunter p300/CBP, Tip60 und Gcn5. Bisher wurde eine Reihe von Lysinen in Myc

identifiziert, die durch eine oder mehrere dieser Histonacetyltransferasen modifiziert werden können (Patel et al, 2004; Vervoorts et al, 2003; Zhang et al, 2005). Es ist noch nicht vollständig geklärt, inwieweit die acetylierten Lysine eventuelle Proteininteraktionen vermitteln oder die Myc-Funktion beeinflussen. Da Lysine aber ebenfalls ubiquitiniert werden können, können beide Modifikationen potentiell miteinander interferieren. Die Resultate aus verschiedenen Publikationen lassen vermuten, dass die Acetylierung von Myc dessen Ubiquitinierung hemmt und darüber die Stabilität erhöht (Patel et al, 2004; Vervoorts et al, 2003).

Eine der am besten charakterisierten Modifikationen von Myc ist die Phosphorylierung der Aminosäuren Ser62 und Thr58, die sich in der Myc-Box I befinden (s. Abb. 1.1) (Gupta et al, 1993; Henriksson et al, 1993). Verschiedene Signalwege regulieren die Phosphorylierung der beiden Aminosäuren, die voneinander abhängig ist: Ser62 wird durch die Ras-aktivierte MAP-Kinase phosphoryliert, was die Voraussetzung für die nachfolgende Phosphorylierung von Thr58 durch die PI3K/Akt-regulierte Kinase GSK3 β ist (Lutterbach & Hann, 1994; Sears et al, 1999; Sears et al, 2000). Erst nach erneuter Dephosphorylierung von Ser62 durch die Phosphatase PP2A wird die Thr58-phosphorylierte Form von Myc durch die E3-Ubiquitin-Ligase Fbw7 erkannt und ubiquitiniert (Welcker et al, 2004; Yada et al, 2004; Yeh et al, 2004). Der Prozess der Ubiquitinierung soll in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

1.5 Ubiquitinierung von Proteinen

Die Ubiquitinierung von Proteinen wurde ursprünglich als Erkennungssignal für den proteasomalen Abbau von Proteinen identifiziert (Ciechanover, 1998). Mittlerweile sind weitaus vielfältigere Funktionen bekannt, wie z. B. die Regulation von DNA-Reparatur, Proteintransport, Rezeptorinternalisierung, Signaltransduktion und Transkription (Übersicht in (Hoeller & Dikic, 2009)). Die Modifikation der Proteine erfolgt dabei durch Ubiquitin, ein hochkonserviertes, ubiquitär exprimiertes Polypeptid von 76 Aminosäuren. Die kovalente Bindung von Ubiquitin an das jeweilige Substratprotein erfolgt durch eine dreiteilige Enzymkaskade (Übersicht in (Pickart, 2001)). Das Ubiquitin-Protein wird dabei ATP-abhängig durch Bildung einer energiereichen Thioesterbindung mit dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1 verknüpft. Im nächsten Schritt erfolgt die Übertragung auf eine

Cystein-Gruppe des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2. Schließlich katalysiert eine E3-Ubiquitin-Ligase den Transfer des Ubiquitins auf das Substratprotein. Dabei wird eine Thioesterbindung zwischen der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysins des Substratproteins und dem C-terminalen Glycin 76 von Ubiquitin gebildet. Alternativ kann auch die N-terminale Aminogruppe des Zielproteins mit Ubiquitin verknüpft werden, wie auch für Myc nachgewiesen werden konnte (Ciechanover & Ben-Saadon, 2004; Popov et al, 2010).

Man unterscheidet je nach Anzahl der gebundenen Ubiquitinmoleküle zwischen Mono-, Multi-, Oligo- und Polyubiquitinierung. Das Ubiquitin-Protein selbst besitzt sieben Lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63), die an der Konjugation beteiligt sein können. Daraus entstehen Ubiquitinketten, die sich in Länge, Topologie und dementsprechend in den funktionellen Auswirkungen unterscheiden (Übersicht in (Li & Ye, 2008)). Am bekanntesten ist die Bildung von K48-verknüpften Ubiquitinketten, die ab einer Kettenlänge von vier Ubiquitinen zu einer Erkennung und Degradierung des Substratproteins durch das Proteasom führt.

1.5.1 Klassifizierung der E3-Ubiquitin-Ligasen

Die Ubiquitinierung von Proteinen ist ein strikt kontrollierter, hochspezifischer Prozess. Die Regulation erfolgt zum Großteil über die mehr als 500 in Säugern bekannten E3-Ubiquitin-Ligasen, die für die Substratspezifität verantwortlich sind (Übersicht in (Farrell & Sears, 2014)). E3-Ubiquitin-Ligasen können in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden, die durch unterschiedliche strukturelle Domänen charakterisiert sind: RING (*really interesting new gene*)-Finger, U-Box und HECT (*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*) (Hatakeyama et al, 2001; Huibregtse et al, 1995; Lorick et al, 1999). Funktionell sind sowohl RING-Finger- als auch U-Box-E3-Ligasen dadurch gekennzeichnet, dass sie nicht direkt den Transfer des Ubiquitinmoleküls auf das Substratprotein katalysieren. Vielmehr vermitteln sie die Assoziation zwischen dem Zielprotein und dem E2-Enzym, das die eigentliche Ubiquitinierungsreaktion übernimmt (Übersicht in (Metzger et al, 2012)).

Zur Familie der HECT-E3-Ubiquitin-Ligasen gehören 28 verschiedene Enzyme, die durch die hochkonservierte C-terminale HECT-Domäne charakterisiert sind. Als erstes Mitglied dieser Familie wurde die E3-Ligase E6-AP identifiziert, die mit dem E6-Adaptorprotein des humanen Papillomavirus interagiert und den Abbau von p53 bewirkt (Huibregtse et al, 1991;

Scheffner et al, 1993; Scheffner et al, 1990). Im Gegensatz zu den genannten RING- und U-Box-E3-Ligasen besitzen die HECT-E3-Ligasen eigene enzymatische Aktivität und sind für den Ubiquitintransfer auf das Substratprotein direkt verantwortlich (Übersicht in (Scheffner & Kumar, 2014)). Dabei wird das Ubiquitinprotein vom E2-Enzym auf die HECT-E3-Ligase übertragen. Es wird eine intermediäre Thioesterbindung mit dem Cystein des aktiven Zentrums des E3-Enzyms gebildet, wonach das Ubiquitinmolekül an das Zielprotein gebunden wird.

1.5.2 Regulation von Myc durch E3-Ubiquitin-Ligasen

Eine der am besten charakterisierten E3-Ubiquitin-Ligasen von Myc ist Fbw7, welches über das Phosphodegron Ser62/Thr58 mit Myc interagiert (s. Abschnitt 1.4.3). Die Fbw7-induzierte Ubiquitinierung führt zum proteasomalen Abbau von Myc. In der Tumorgenese ist der Prozess relevant, da das Burkitt-Lymphom häufig Mutationen im Thr58 aufweist, die zu einer Stabilisierung von Myc führen (Bahram et al, 2000; Gregory & Hann, 2000). Neben Fbw7 vermittelt eine Reihe weiterer E3-Ligasen die Ubiquitinierung von Myc, was sowohl einen destabilisierenden als auch aktivierenden Einfluss haben kann (Abb. 1.3): β -Ttcp, Chip, Fbxo28, Huwe1, Skp2, Trim32 und Truss (Adhikary et al, 2005; Cepeda et al, 2013; Choi et al, 2010; Kim et al, 2003; Paul et al, 2013; Popov et al, 2010; Schwamborn et al, 2009; von der Lehr et al, 2003; Zhao et al, 2008).

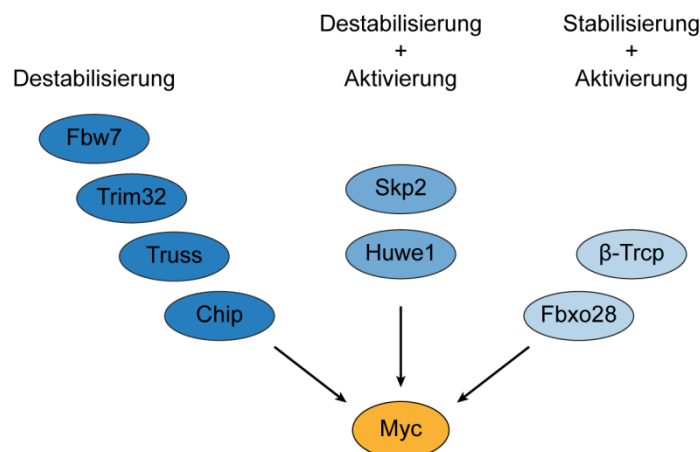


Abb. 1.3 Einfluss verschiedener E3-Ubiquitin-Ligasen auf Myc

Schematische Darstellung von E3-Ubiquitin-Ligasen und ihre Rolle in der Regulation von Myc. Die E3-Ubiquitin-Ligasen Fbw7, Trim32, Truss und Chip ubiquitinieren Myc und destabilisieren damit das Protein. Die Ubiquitinierung durch Skp2 und Huwe1 hat sowohl einen aktivierenden als auch destabilisierenden Effekt auf Myc. β-Trcp stabilisiert Myc und Fbxo28 induziert die Transaktivierungsfunktion.

Skp2 ist eine der E3-Ligasen, die sowohl die Stabilität als auch die Aktivität von Myc regulieren, wofür zwei mögliche Mechanismen in Frage kommen. Einerseits ist der Abbau von Myc wahrscheinlich an die Transaktivierungsfunktion gekoppelt, was als sogenanntes „*licensing*“ bezeichnet wird. So stimuliert die Skp2-vermittelte Ubiquitinierung zuerst die transkriptionelle Aktivität von Myc, führt aber parallel zur Degradierung durch das Proteasom (Kim et al, 2003). Andererseits kann die Skp2-induzierte Ubiquitinierung auch zur Rekrutierung von ATPasen der 19S-Proteasom-Untereinheit an Promotoren von Myc-aktivierten Zielgenen führen, die zur Transaktivierung beitragen (von der Lehr et al, 2003). Auch die Ubiquitinierung von Myc durch Fbxo28 induziert die Myc-vermittelte Transkription und Transformation (Cepeda et al, 2013). Popov und Kollegen konnten überdies zeigen, dass die E3-Ubiquitin-Ligase β-Trcp heterotypische Ubiquitinketten am N-Terminus von Myc bildet (Popov et al, 2010). Im Gegensatz zur Fbw7-induzierten Ubiquitinierung des N-Terminus führt dies zur Stabilisierung von Myc. Die HECT-E3-Ligase Huwe1 spielt eine besondere Rolle in der Myc-Funktion und wird nachfolgend detailliert beschrieben.

1.5.3 Strukturelle Eigenschaften der HECT-E3-Ubiquitin-Ligase Huwe1

Huwe1 (*HECT, UBA and WWE containing 1*, auch HectH9, Arf-BP1, Mule, Ureb1, Lasu) ist ein etwa 480 kDa großes Protein und gehört zur Familie der HECT-E3-Ubiquitin-Ligasen (Übersicht in (Bernassola et al, 2008)). Im C-Terminus besitzt Huwe1 die etwa 350 Aminosäuren große, enzymatisch aktive HECT-Domäne (Abb. 1.4). Strukturanalysen zeigen, dass die HECT-Domäne von Huwe1, wie auch HECT-Domänen im Allgemeinen, aus einem N-terminalen und einem C-terminalen Flügel besteht, die durch eine flexible Achsenregion miteinander verbunden sind (Huang et al, 1999; Pandya et al, 2010; Verdecia et al, 2003). Der N-terminale Flügel enthält die Bindestelle für das E2-Enzym, während in der C-terminalen Region das Cystein des aktiven Zentrums zu finden ist. Während des Ubiquitintransfers kommt es über die Achsenregion zu einer Konformationsänderung, bei der N- und C-terminaler Flügel die Orientierung zueinander verändern. Dadurch kann das Ubiquitinmolekül vom konjugierenden Enzym E2 auf das aktive Cystein der HECT-E3-Ligase übertragen werden.



Abb. 1.4 Struktur der E3-Ubiquitin-Ligase Huwe1

Schema der Domänen von Huwe1. Die E3-Ubiquitin-Ligase Huwe1 ist charakterisiert durch die C-terminale HECT (*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*)-Domäne. Weitere Domänen dienen der Interaktion mit Proteinen (grün) oder es konnten bisher keine Funktionen zugeordnet werden (gelb). ARLD1, ARLD2: *ARM (Armadillo) repeat-like domain 1/2*; UBA: *Ubiquitin-associated*; WWE: benannt nach den konservierten Aminosäuren, Tryptophan (W) und Glutamat (E); BH3: *Bcl2 homology*.

Im N-Terminus von Huwe1 finden sich weitere strukturelle Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. UBA (*Ubiquitin-associated*)-Domänen sind in einer Vielzahl von Proteinen zu finden, die am Ubiquitin-Signalweg beteiligt sind, und vermitteln die Interaktion mit Ubiquitin selber oder mit Ubiquitin-ähnlichen Domänen (Übersicht in (Mueller & Feigon, 2002)). WWE-Domänen vermitteln ebenfalls die Assoziation mit anderen Proteinen und sind häufig an Ubiquitin-assoziierten Prozessen beteiligt (Übersicht in (Aravind, 2001)). Für beide Domänen konnten bisher allerdings keine spezifischen Interaktionspartner von Huwe1 identifiziert werden. Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass die BH3 (*Bcl2 homology*)-Domäne

von Huwe1 der Interaktion mit dem Substratprotein Mcl1 dient (Warr et al, 2005; Zhong et al, 2005). Den Regionen ARLD1 und ARLD2 (*ARM (Armadillo) repeat-like domains*) konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden, sie sind auch bekannt unter den Namen DUF908 und DUF913 (*domain of unknown function*).

1.5.4 Funktionen und Substratproteine von Huwe1

In den letzten Jahren wurde eine steigende Anzahl an Substratproteinen von Huwe1 identifiziert. Eine der ersten Publikationen zeigte, dass Huwe1 die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 *in vitro* ubiquitiniert, was ein wichtiger Prozess während der Spermatogenese ist (Liu et al, 2005). Es folgten Analysen von weiteren Zielproteinen, die vielfältige Funktionen in der Regulation von Zellzyklus, Apoptose, DNA-Reparatur und Transkription besitzen. Für die meisten Substratproteine von Huwe1 wurde beschrieben, dass die Huwe1-induzierte Ubiquitinierung die Degradierung der Proteine über das Proteasom auslöst. Dazu gehören Cdc6, DNA-Polymerase β , Hdac2, Mcl1, Mitofusin2, Miz1, MyoD, N-Myc, p53, RASSF1C und TopBP1 (Hall et al, 2007; Herold et al, 2008; Leboucher et al, 2012; Noy et al, 2012; Parsons et al, 2009; Zhang et al, 2011a; Zhou et al, 2012). Die Regulation einiger Substratproteine durch Huwe1 soll hier kurz erläutert werden.

Das anti-apoptotische Protein Mcl1 wird nach DNA-Schaden durch Huwe1 ubiquitiniert und daraufhin proteasomal degradiert (Warr et al, 2005; Zhong et al, 2005). Die Inaktivierung von Huwe1 führt in diesem Fall zu einer Stabilisierung von Mcl1 und zu einer abgeschwächten durch DNA-Schaden ausgelösten Apoptose-Antwort. Ebenfalls an der Regulation von Apoptose beteiligt ist Huwe1 über die direkte Bindung und Ubiquitinierung des Tumorsuppressors p53, was den proteasomalen Abbau von p53 induziert (Chen et al, 2005; Yoon et al, 2005). Dieser Prozess wird zusätzlich durch Arf reguliert, das ebenfalls an Huwe1 bindet und dessen Aktivität gegenüber p53 reprimiert (Chen et al, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Huwe1 p53 in Arf-abhängiger Weise stabilisiert und Apoptose in p53-positiven Zellen induziert. Gleichzeitig führt die Inaktivierung von Huwe1 in p53-negativen Zellen zum Zellzyklusarrest, worüber Huwe1 vermutlich p53-unabhängige tumorsuppressive Eigenschaften von Arf vermittelt. Weitere Publikationen bestätigen die Rolle von Huwe1 in der Regulation von p53-abhängigen und -unabhängigen Prozessen zur

Kontrolle von Proliferation, Apoptose und Zellhomöostase (Hao et al, 2012; Kon et al, 2012; Kurokawa et al, 2013; Qi et al, 2012; Qi et al, 2013).

Hdac2 ist eine Histondeacetylase (HDAC), die sowohl Histone als auch Nicht-Histon-Proteine deacetyliert und darüber eine große Anzahl zellulärer Prozesse steuert (Übersicht in (Kramer, 2009)). Huwe1 ubiquitiniert Hdac2 und induziert somit dessen proteasomalen Abbau (Zhang et al, 2011a). In Huwe1-defizienten Zellen akkumuliert Hdac2, was in einer verminderten Aktivierung von p53 resultiert und die apoptotische Antwort nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren abschwächt.

Auch die Stabilität von Miz1 wird durch Huwe1 reguliert. Zum einen induziert TNF α die Huwe1-vermittelte Polyubiquitinierung und Degradierung von Miz1 (Yang et al, 2010). Zum anderen stabilisiert die Huwe1-Deletion Miz1 in einem Mausmodell der Hautkarzinogenese, was über einen stabilisierten Myc/Miz1-Komplex zu einer verstärkten Repression der Miz1-Zielgene *CDKN1A* und *CDKN2B* führt (Inoue et al, 2013). Dies wiederum resultiert sowohl in einer erhöhten Proliferation von primären Keratinozyten als auch in einer verstärkten Ausbildung von Hauttumoren.

Im neuronalen Gewebe ist Huwe1 an der Regulation der N-Myc-Funktion beteiligt. In Huwe1-defizienten murinen embryonalen Stammzellen und neuronalen Zellen wird N-Myc stabilisiert, was zu einer Expansion dieser Zellpopulationen führt und die Differenzierung sowohl im embryonalen Gehirn als auch postnatal im Cerebellum hemmt (D'Arca et al, 2010; Zhao et al, 2008). Dies wird u. a. durch Akkumulation von N-Myc und nachfolgender direkter Induktion der *DLL3*-Expression, einem Liganden des Notch-Signalwegs, erreicht (Zhao et al, 2009).

Huwe1 ist zudem fähig zur Auto-Ubiquitinierung, was durch die Ubiquitin-spezifischen Proteasen Usp4 und Usp7S (einer an Ser18 phosphorylierten Isoform) gehemmt werden kann und zu einer Stabilisierung der E3-Ligase führt (Khoronenkova & Dianov, 2013; Zhang et al, 2011b). Depletionsexperimente von Usp4 und Usp7S zeigen, dass die Destabilisierung von Huwe1 über eine Akkumulation von p53 eine erhöhte DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur induziert.

1.5.5 Modifikation von Myc durch Huwe1

Die Ubiquitinierung von Myc durch Huwe1 zeigt keine oder nur moderate Effekte auf die Stabilität von Myc (Adhikary et al, 2005; Inoue et al, 2013; Zhao et al, 2008). Adhikary und Kollegen beschrieben stattdessen die Ubiquitinierung durch Huwe1 als aktivierenden Mechanismus der Myc-Funktion (Adhikary et al, 2005). Es wurde gezeigt, dass Huwe1 und Myc miteinander interagieren und Huwe1 die Ubiquitinierung von Myc *in vitro* und *in vivo* induziert. Die Modifikation erfolgt dabei mit K63-verknüpften Polyubiquitin-Ketten. Mit Hilfe einer Mutante von Myc, in der sechs Lysine zu Argininen mutiert wurden (KR₆) und die durch Huwe1 nicht mehr ubiquitiniert wird, wurde nachgewiesen, dass diese Ubiquitinierung keinen Einfluss auf die Stabilität von Myc hat, aber notwendig für die Transaktivierung von Myc-Zielgenen ist. So konnte auch die Überexpression von Myc in Huwe1-depletierten Zellen die Expression Myc-aktivierter Zielgene nicht induzieren. Da das Myc-interagierende Protein Miz1 kompetitiv an Huwe1 bindet, wird die Huwe1-vermittelte Ubiquitinierung von Myc durch Miz1 inhibiert. Neben den K63-verknüpften Polyubiquitin-Ketten, die keinen proteasomalen Abbau vermitteln, könnte die Interaktion von Myc mit Miz1 zudem eine Erklärung für den fehlenden Einfluss von Huwe1 auf die Myc-Stabilität sein. Es wurden verschiedene Lysine von Myc identifiziert, die ubiquitiniert werden (Kim et al, 2011). Bisher ist nicht bekannt, welche Lysine von Myc kritisch für den Abbau des Proteins sind und welche von Huwe1 ubiquitiniert werden. Einige der identifizierten Lysine befinden sich aber in einer Region von Myc, die notwendig für die Interaktion mit Miz1 ist (Herold et al, 2002), sodass für den Abbau kritische Lysine durch die Komplexbildung von Myc und Miz1 verdeckt sein könnten.

1.6 Die Rolle von Myc und Huwe1 im Kolonkarzinom

Das Kolonkarzinom ist mit knapp 700.000 Fällen weltweit die häufigste maligne Krebserkrankung des Gastrointestinaltrakts (Jemal et al, 2011). Bei der Karzinogenese spielen sowohl der Wnt- als auch der Ras-Signalweg eine Rolle und in beiden Signalwegen können genetische Veränderungen im kolorektalen Karzinom nachgewiesen werden (Cancer Genome Atlas, 2012). Im Falle des Wnt-Signalwegs sind dies vorrangig Mutationen in den Proteinen Apc oder β -Catenin, die zu einer konstitutiven Aktivierung der Signalkaskade führen (White et al, 2012). Eines der bedeutendsten Zielproteine sowohl des Wnt- als auch des Ras-

Signalwegs ist Myc. Genexpressionsanalysen von kolorektalen Tumorproben konnten nachweisen, dass die meisten Tumore durch eine Überexpression und verstärkte Funktion von Myc charakterisiert sind (Cancer Genome Atlas, 2012). Hierbei ist Myc für die erhöhte Proliferation und eingeschränkte Differenzierung von Kolonzellen verantwortlich (van de Wetering et al, 2002). In Mausmodellen von Kolonkarzinomen wurde bisher gezeigt, dass der konditionale *knockout* von Apc im Dünndarm zu einer uneingeschränkten Proliferation und gehemmten Differenzierung der Kolonzellen führt (Sansom et al, 2004). Um die Rolle von Myc dabei genauer zu untersuchen, wurden in späteren Studien Apc und Myc gleichzeitig im murinen Dünndarm deletiert. Die simultane Deletion von Myc rettete den Phänotyp der Apc-Defizienz, womit belegt wurde, dass Myc essentiell ist für die durch Apc-Deletion verursachten kolorektalen Neoplasien (Sansom et al, 2007).

Die E3-Ubiquitin-Ligase Huwe1 ist in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert, u. a. auch im Kolonkarzinom (Adhikary et al, 2005; Confalonieri et al, 2009; Yoon et al, 2005). Durch die im vorangegangenen Abschnitt erläuterte Assoziation mit Myc könnte Huwe1 eine bedeutende Rolle als Onkoprotein in der Karzinogenese von Darmkrebs haben. Bisher sind aber weder Mausmodelle noch Zellkulturdaten vorhanden, die dies bestätigen.

1.7 Tumortherapeutische Ansätze einer Myc-Inhibition

Bei vielen Tumorerkrankungen ist Myc essentiell für die Karzinogenese. So zeigt die Analyse verschiedener humaner Tumorzelllinien, dass die shRNA-vermittelte Depletion von Myc einen permanenten Proliferationsarrest induziert (Wang et al, 2008). Zudem bestätigen Mausmodelle, dass eine kontinuierliche Expression von Myc notwendig für die Aufrechterhaltung der Tumore ist (Übersicht in (Arvanitis & Felsher, 2006)). In den letzten Jahren wurde daher eine Vielzahl von Strategien einer Inhibition von Myc untersucht (Übersicht in (Vita & Henriksson, 2006)). Ein Ansatz besteht in der Inhibition von Myc durch niedermolekulare Substanzen, welche die Heterodimerisierung von Myc/Max hemmen. Mehrere Gruppen konnten nachweisen, dass diese Substanzen einen Proliferationsarrest induzieren, sowie die Transaktivierung von Zielgenen und Transformation von Fibroblasten durch Myc reprimieren (Berg et al, 2002; Yin et al, 2003). Einer dieser Inhibitoren, 10058-F4, zeigt in Zellen verschiedener hämatologischer Tumore sowie des hepatozellulären Karzinoms anti-proliferative und pro-apoptotische Effekte (Gomez-Curet et al, 2006; Holien et al, 2012;

Huang et al, 2006; Lin et al, 2007). Allerdings gibt es bisher keine Studien, welche die *in vivo* Wirksamkeit der Substanzen belegen. So wurden 10058-F4 und ein weiterer Myc/Max-Inhibitor, 10074-G5, in Xenograft-Mausmodellen des Prostatakarzinoms bzw. des Burkitt-Lymphoms eingesetzt, wobei aber durch die schnelle Metabolisierung der Substanzen keine Effekte auf das Tumorwachstum nachgewiesen werden konnten (Clausen et al, 2010; Guo et al, 2009). Eine weitere Möglichkeit besteht in der indirekten Inhibition der *MYC*-Expression durch die Substanz JQ1, die das Bromodomänen-Protein Brd4 inhibiert (s. Abschnitt 1.4.1). JQ1 führt in verschiedenen hämatologischen Tumormodellen zu einem Proliferationsarrest in Zellkulturexperimenten, einer Repression von Myc-induzierten Zielgenen und zu einer Tumorregression in Mausmodellen (Delmore et al, 2011; Mertz et al, 2011; Ott et al, 2012). Soucek und Kollegen generierten durch Mutagenese von vier Aminosäuren in der bHLH-LZ-Domäne von Myc das dominant-negative Protein Omomyc (Soucek et al, 1998). In NIH3T3-Fibroblasten inhibiert Omomyc die transkriptionelle Aktivierung durch Myc und die Proliferation, der Mechanismus ist dabei aber noch nicht vollständig geklärt. *In vivo* konnten anti-tumorale Effekte von Omomyc in einem Myc-induzierten Mausmodell der Hautkarzinogenese nachgewiesen werden, in dem sowohl Apoptose als auch die Differenzierung der Keratinozyten gefördert wird (Soucek et al, 2004). Auch in einem Ras-induzierten Mausmodell des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms wurde gezeigt, dass die systemische Expression von Omomyc eine Regression der Lungentumore mit zu tolerierenden Nebenwirkungen bewirkt (Soucek et al, 2002; Soucek et al, 2013).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Proto-Onkoprotein Myc ist in etwa 70 % aller humanen Tumore dereguliert. Im Kolonkarzinom übernimmt überexprimiertes Myc dabei eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese. Daher ist es notwendig, neue Strategien einer Inhibition von Myc zu entwickeln. Da Myc als Transkriptionsfaktor keine enzymatische Aktivität besitzt und zudem über große Interaktionsflächen mit verschiedenen Partnerproteinen und DNA interagiert, gestaltet sich die direkte Inhibition als schwierig. Alternative Ansätze bestehen in der Modulation von Proteinen, die das Myc-Protein oder dessen Funktion regulieren. Ein mögliches Zielprotein dafür ist Huwe1, eine E3-Ubiquitin-Ligase, die Myc ubiquitiniert und die Transaktivierungsfunktion von Myc dadurch induziert. Huwe1 ist ebenfalls in verschiedenen Tumorarten überexprimiert, u. a. im Kolonkarzinom. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit in kolorektalen Tumorzellen eine Hemmung der Myc-Funktion über die Inhibition von Huwe1 erzielt werden kann.

Dafür sollte mittels Depletion von Huwe1 durch spezifische shRNAs die Rolle der E3-Ubiquitin-Ligase in der Proliferation von Kolonkarzinomzelllinien und der Aktivierung von Myc-induzierten Zielgenen validiert werden. Zusätzlich wurden neue niedermolekulare Inhibitorsubstanzen von Huwe1 in Kooperation mit Boehringer Ingelheim identifiziert, die auf ihre Aktivität und Spezifität gegenüber Huwe1 analysiert wurden. Es sollte untersucht werden, ob durch die Inhibition von Huwe1 die Proliferation kolorektaler Tumorzellen spezifisch blockiert werden kann. Des Weiteren wurde analysiert, inwieweit die Huwe1-Inhibitorsubstanzen die Transaktivierungsfunktion von Myc beeinflussen und ob darüber eine Hemmung der Myc-Aktivität erzielt werden kann. Hierbei sollte ebenfalls mit Hilfe der Huwe1-Inhibitoren mechanistisch geklärt werden, wie Huwe1 zur Aktivität von Myc beiträgt.

2 Material

2.1 Bakterienstämme und Zelllinien

2.1.1 Bakterienstämme

DH5α	<i>Escherichia coli</i> ; chromosomaler Genotyp: F-, ϕ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1; verwendet zur Herstellung und Amplifikation von Plasmiden
XL1blue	<i>Escherichia coli</i> ; chromosomaler Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]; verwendet zur Amplifikation von Plasmiden auf der Basis von pLKO-Vektoren

2.1.2 Zelllinien

HCT116	humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC)
HEK293T	humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC)
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie (ATCC)
HT-29	humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC)
Ls174T	humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC)
Phoenix	humane Verpackungszelllinie (Phoenix-Eco) zur Herstellung von MoMuLV-Retroviren; von der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T abstammend (Kinsella & Nolan, 1996)
SW480	humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC)
SW620	humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC)
U2OS	humane Osteosarkomzelllinie (ATCC)

2.1.3 Primäre Zellen

E14 murine embryonale Stammzellen

2.2 Kultivierungsmedien und Zusätze

2.2.1 Medien und Antibiotika zur Bakterienkultivierung

LB-Medium 1 % (w/v) Baktotrypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

LB-Agar LB-Medium mit 1,2 % (w/v) Bakto-Agar; nach dem Autoklavieren wurde der LB-Agar auf 50 °C abgekühlt und 20 ml auf eine 10 cm Schale gegossen.

Antibiotika Abhängig vom Resistenzgen des Plasmids wurden dem LB-Medium oder dem LB-Agar 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin hinzugefügt.

2.2.2 Medien und Zusätze für die Säugerzellkultivierung

2.2.2.1 Medien

Zur Kultivierung von Säugerzellen wurde DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) oder RPMI-1640 verwendet (Sigma). Zugewetztes fötales Kälberserum (FBS, Biochrom AG) wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Normales Kulturmedium enthielt zusätzlich 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml, PAA). Zur Kultivierung von E14-Zellen wurden die Kulturschalen mit 0,1 % Gelatine beschichtet.

Ls174T, SW480, HT-29 RPMI-1640

10 % (v/v) FBS

E14 DMEM

	15 % (v/v) FBS
	1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, Gibco)
	6 µg/ml LIF (<i>leukaemia inhibitory factor</i> , Arbeitsgruppe Gessler)
	0,05 mM β-Mercaptoethanol (Sigma)
andere Zellen	DMEM
	10 % (v/v) FBS
Einfriermedium	DMEM oder RPMI-1640
	35 % (v/v) FBS
	10 % (v/v) DMSO

Zum Einfrieren von E14-Zellen wurden die oben genannten Zusätze hinzugefügt.

2.2.2.2 Antibiotika

Zur Selektion infizierter Zellen wurden folgende Antibiotika verwendet:

Puromycin (InvivoGen)	2 µg/ml
Zeocin (InvivoGen)	50 - 500 µg/ml

Eventuelle Mykoplasmen-Kontaminationen in der Säugerzellkultivierung wurden mit Plasmocin (InvivoGen) in einer Konzentration von 25 µg/ml über 2 Wochen hinweg behandelt. Nach jeweils 2 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel mit erneuter Zugabe von Plasmocin.

2.2.2.3 Weitere Zusätze

Cycloheximid (CHX, Sigma)	100 µg/µl in Ethanol
MG-132 (Calbiochem)	10 µM in Ethanol
Polybren (Sigma)	4 µg/ml in aqua bidest

Doxzyklin (Sigma) 1 µg/ml in Ethanol

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Primer

Alle verwendeten DNA-Primer wurden von den Firmen Invitrogen bzw. Operon synthetisiert. Das Primerdesign erfolgte für die qRT-PCR mit der *Universal ProbeLibrary* von Roche oder für eine Chromatin-Immunpräzipitation mit dem Programm Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Um die Amplifikation genomischer DNA bei der qRT-PCR zu verhindern, wurden die Sequenzen der Oligonukleotide Exon-Intron-übergreifend gewählt.

Primer für qRT-PCR

Gen/Bezeichnung	Sequenz <i>forward</i> Primer (5'→3')	Sequenz <i>reverse</i> Primer (5'→3')
<i>ACTB</i>	cctgcctttgccgatcc	ggatcttcatgaggtagtcagtc
<i>B2M</i>	gtgctcgcgctactctctc	gtcaacttcaatgtcggat
<i>CCNA2</i>	tgtctcatggaccttcacca	ctctgggtgggtgaggagag
<i>CDC25A</i>	atctcttcacacagaggcagaa	ccctggttcaactgctatctctt
<i>CDKN1A</i>	cgatgccaacctcctcaacga	tcgcagacctccagcatcca
<i>GADD45A</i>	cagaagaccgaaaggatgga	atctctgtcgtcgtcctcgt
<i>HUWE1</i>	ccagaagttcttcttgagggtact	gcctaaaccggaggaacc
<i>MUC2</i>	caagatcttcatggggagga	gaacacgggtggtcctctgt
<i>MYC</i>	caccagcagcgactctga	gatccagactctgaccttttgc
<i>NCL</i>	ccacttgctcgcttcaca	tcttggggtcaccttgattt
<i>ODC1</i>	aaagtggttttgcggtattg	cgaagggtctcaggatcggtg
<i>RPS14</i>	ggcagaccgagatgaatcctca	cagggtccaggggtcttggtcc
<i>TP53</i>	ccgcagtcagatcctagcg	aatcatccattgcttgggacg
<i>VAMP4</i>	aaggagaaatcttttgaagatga	ggtccagatgggtccccttag

Tabelle 1: Primer für qRT-PCR

Angegeben für die jeweiligen Primer sind die Bezeichnung des amplifizierten Gens und die Sequenzen (*forward* und *reverse*) der Oligonukleotide.

Primer für qRT-PCR nach Chromatin-Immunpräzipitation

Gen/Bezeichnung	Sequenz <i>forward</i> Primer (5'→3')	Sequenz <i>reverse</i> Primer (5'→3')
<i>ACTB</i>	cgttccgaaagttgcctttt	gccgctggggtttataggg
<i>HSPE1</i>	ctcggttcagaactttcca	ggtgaaagaactacccttcg
Intergenische		
Region (IR)	tttctcacattgccctgt	tcaatgctgtaccaggcaaa
<i>VAMP4</i>	cagtgggtgttctccta	ccgagccctattcacctaaa

Tabelle 2: Primer für qRT-PCR nach Chromatin-Immunpräzipitation

Angegeben für die jeweiligen Primer sind die Bezeichnung des amplifizierten Gens bzw. der DNA-Region und die Sequenzen (*forward* und *reverse*) der Oligonukleotide.

2.3.2 Plasmide*Leervektoren*

pcDNA3.1	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promoter (Invitrogen)
pRetroSuper puro	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit RNA-Polymerase III-abhängigem H1-RNA-Promoter (zur Expression von shRNAs) und Puromycin-Resistenzgen (Brummelkamp et al, 2002)
pLKO.1	Vektor mit Puromycin-Resistenzgen zum Einschleusen von shRNAs in Lentiviren (TRC Konsortium)

Lentivirale Verpackungsplasmide

psAX.2	Plasmid, das für Proteine des lentiviralen Virionen-Verpackungssystems (HIV gag, pol, rev) kodiert (Naldini et al, 1996)
pMD2.G	Plasmid, welches für die lentiviralen Hüllproteine (VSV-G env) kodiert (Naldini et al, 1996)

Expressionsplasmide zur transienten Überexpression

Alle im Folgenden aufgelisteten Vektoren waren bereits in der Gruppe Prof. Dr. Martin Eilers vorhanden oder wurden von anderen Arbeitsgruppen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

pcDNA3.1 Myc	pcDNA3.1 mit kodierender Sequenz von <i>MYC</i>
pcDNA3.1 Mcl1	pcDNA3.1 mit kodierender Sequenz von <i>MCL1</i> (Zhong et al, 2005)
pCMV HA-Huwe1 wt	pCMV mit kodierender Sequenz von <i>HUWE1</i> (Kristian Helin)
pCMV HA-ΔN-Huwe1 wt	pCMV mit 3'-Ende der kodierenden Sequenz von <i>HUWE1</i> (5.718 Basen) und C-terminalem Hämagglutinin (HA)- <i>Tag</i> (Kristian Helin)
pcDNA3.1 His ₆ -Ubiquitin	pcDNA3.1 mit kodierender Sequenz von Ubiquitin und Hexa- Histidin (His ₆)- <i>Tag</i>

2.3.3 shRNA-Sequenzen

Zur Depletion von Proteinen wurden shRNAs verwendet, die entweder im retroviralen Vektor pRetroSuper oder im lentiviralen pLKO.1-Vektor enthalten waren.

shRNA-Sequenzen

Bezeichnung	Zielsequenz
shHuwe1-1	gcagcagtagacagactttaa
shHuwe1-2	gcccaaccctcctcttata
shp53	ggtgaaccttagtacctaaa
shScrambled (Ktr)	cataagctgagatactca

Tabelle 3: shRNA-Sequenzen

Es sind die Sequenzen der verwendeten shRNAs angegeben, die in den Vektoren pRetroSuper oder pLKO.1 eingesetzt wurden.

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

Protein	Antikörpertyp	Verwendung	Klon/Herkunft
AcH3	K, poly	ChIP	Upstate (06-599)
AcH4	K, poly	ChIP	Upstate (06-866)
Arf-BP1	K, poly	WB	Abcam (ab65153)
Cdk2	K, poly	WB	Santa Cruz (M2, sc-163)
c-Myc	M, mono	WB	9E10, eigene Herstellung
c-Myc	M, mono	WB	Santa Cruz (C-33, sc-42)
c-Myc	K, poly	WB, ChIP	Santa Cruz (N-262, sc-764)
H2B	K, poly	WB	Abcam (ab1790)
H3	K, poly	ChIP	Abcam (ab1791)
HA	M, mono	WB, IP	Covance (16B12)
Hdac2	K, poly	WB	Santa Cruz (H-54, sc-899)
Mcl1	K, poly	WB	Santa Cruz (S-19, sc-19)
Miz1	M, mono	WB, ChIP	10E2, eigene Herstellung
N-Myc	M, mono	WB	BD (B8.4.B)
Oct-4	K, poly	WB	Santa Cruz (H-134, sc-9081)
p53	M, mono	WB	Santa Cruz (DO-1, sc-126)
TopBP1	K, poly	WB	Novus (NB 100-217)
Vinculin	M, mono	WB	Sigma (hVIN-1)
β-Aktin	M, mono	WB	Sigma (AC-15, A5441)
β-Tubulin	M, mono	WB	Chemicon (MAB3408)

Tabelle 4: Antikörper

Antikörpertyp: M = Maus; K = Kaninchen; mono = monoklonal; poly = polyklonal

Verwendung: ChIP = Chromatin-Immunpräzipitation; IP = Immunpräzipitation; WB = Western Blot

2.4.2 Sekundärantikörper für Western Blot

anti-Kaninchen-HRP	Esel-anti-Kaninchen-Immunglobulin, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (Amersham)
anti-Maus-HRP	Esel-anti-Maus-Immunglobulin, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (Amersham)

2.4.3 Kontrollseren für Immunpräzipitation und Chromatin-Immunpräzipitation

Maus IgG	polyklonales Mausserum (Sigma)
Kaninchen IgG	polyklonales Kaninchenserum (GE Healthcare)

2.5 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von den Firmen Acros Organics, AppliChem, Calbiochem, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma bezogen.

2.6 Standards, Enzyme und Kits

2.6.1 Standards

DNA-Marker	GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)
Protein-Marker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)
	HiMark™ Pre-Stained HMW Protein Standard (Invitrogen)

2.6.2 Enzyme und Kits

DNase-freie RNase A	Sigma
GeneJET Gel Extraction Kit	Fermentas
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Invitrogen
RNase-freie DNase I	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
StdSens Experion RNA Chip	Bio-Rad
SYBR Green qRT-PCR Master Mix	Thermo Scientific

Immobilon Western Substrat

Millipore

2.7 Puffer und Lösungen

Blockierungslösung für

PVDF-Membranen

5 % (w/v) Milchpulver oder BSA in TBS-T

Bradford-Reagenz

0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

4,7 % (w/v) Ethanol 95 %

8,5 % ortho-Phosphorsäure

ChIP-Lysepuffer I

5 mM PIPES, pH 8,0

85 mM KCl

0,5 % (v/v) NP-40

ChIP-Lysepuffer II (RIPA)

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

1 % (v/v) NP-40

1 % (w/v) DOC

0,1 % (w/v) SDS

1 mM EDTA

ChIP-Waschpuffer I

20 mM Tris, pH 8,1

150 mM NaCl

2 mM EDTA

0,1 % (w/v) SDS

1 % (v/v) Triton X-100

ChIP-Waschpuffer II

20 mM Tris, pH 8,1

Material

	500 mM NaCl
	2 mM EDTA
	0,1 % (w/v) SDS
	1 % (v/v) Triton X-100
ChIP-Waschpuffer III	10 mM Tris, pH 8,1
	250 mM LiCl
	1 % (v/v) NP-40
	1 % (w/v) SDS
	1 mM EDTA
ChIP-Elutionspuffer	1 % (w/v) SDS
	100 mM NaHCO ₃
DNA Ladepuffer (6 x)	10 mM EDTA, pH 8,0
	0,2 % (w/v) Orange G
	40 % (w/v) Saccharose
Fraktionierungspuffer A	0,34 M Sucrose
	10 mM HEPES
	10 mM KCl
	1,5 mM MgCl ₂
	10 % Glycerin
	0,2 mM EGTA
Fraktionierungspuffer B	3 mM EDTA
	0,2 mM EGTA
Kristallviolettlösung	0,1 % (w/v) Kristallviolett
	in 20 % (v/v) Ethanol

Material

PBS (1 x)	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10,1 mM Na ₂ HPO ₄
	1,76 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	1 x PBS
	0,5 % (v/v) Tween-20
PEI-Transfektionslösung	450 µl PEI (10 %, MW 25.000 g/mol, Sigma)
	150 µl HCl (2 N)
	49,5 ml aqua bidest
Phosphatpuffer, pH 8,0	1 M Na ₂ HPO ₄
	pH 8,0 mit 1 M NaH ₂ PO ₄ einstellen
RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris, pH 7,4
	150 mM NaCl
	1 % (v/v) NP-40
	0,5 % (w/v) DOC
	0,1 % (w/v) SDS
SA-β-Gal-Färbelösung	1 mg/ml X-Gal (in Dimethylformamid)
	20 % (v/v) Zitronensäure/Natriumphosphatpuffer
	5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆]
	5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆]
	150 mM NaCl
	2 mM MgCl ₂
Sammelgel 4 %	4 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 30 (37,5:1)
	125 mM Tris-HCl, pH 6,8

Material

	0,1 % (w/v) SDS
	0,1 % (w/v) APS
	0,1% (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base
	250 mM Glycin
	0,1 % SDS
SDS-Probenpuffer (3 x)	187,5 mM Tris, pH 6,8
	30 % (v/v) Glycerin
	6 % SDS
	0,03 % Bromphenolblau
	2 M β -Mercaptoethanol
Stripping-Puffer	200 mM Glycin
	0,1 % SDS
	1 % Tween-20
	pH 2,3 mit HCl
TAE (50 x)	2 M Tris, pH 8,0
	5,7 % Essigsäure
	50 mM EDTA
10 x Tank-Blot-Puffer	1,9 M Glycin
	250 mM Tris-Base
	0,05 % SDS
	pH 8,0
TBS (20 x)	500 mM Tris-Base, pH 7,4
	2,8 M NaCl

Material

TBS-T	1 x TBS 0,2 % Tween-20
TE	10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA
TNN-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 120 mM NaCl 5 mM EDTA 0.5 % NP-40 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 100 mM NaF 2 mM Na_3VO_4
Trenngel 7,5 - 15 %	7,5 - 15 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 30 (37,5:1) 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
Trypsinlösung	0,25 % Trypsin 5 mM EDTA 22,3 mM Tris, pH 7,4 125 mM NaCl
Ubi-Lysepuffer A (Mcl1)	6 M Guanidin-HCl 100 mM Phosphat-Puffer, pH 8,0 10 mM Imidazol

	0,4 % Triton X-100
	0,125 M NaCl
Ubi-Lysepuffer A (Myc)	6 M Guanidin-HCl
	20 mM Imidazol
	in PBS
Ubi-Puffer B	25 mM Tris-HCl, pH 6,8
	20 mM Imidazol
Zitronensäure/Natriumphosphatpuffer	126 mM Na ₂ HPO ₄
	36,8 mM Zitronensäure
	pH 6,0

2.8 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Handschuhe und sonstiges Zellkultur- und Plastikmaterial wurden von den Firmen Applied Biosystems, Eppendorf, Greiner, Kimberley-Clark, Nunc, Sarstedt und VWR International bezogen.

2.9 Geräte und Membranen

Blottingapparatur	Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad)
	PerfectBlue Tank Electro Blotter Web S (Peqlab)
Durchflusszytometer	BD FACS Canto™ II (BD Biosciences)
Entwicklermaschine	LAS-4000 (Fujifilm Global)
Heat Sealing	ALP™ 50V (Thermo Scientific)
Heizblock	Dry Bath System (Starlab)
	Thermomixer® comfort (Eppendorf)

Mikroskop	Axiovert 40CFL (Zeiss)
PCR-Gerät	Mastercycler pro S (Eppendorf)
Photometer	Ultrospec TM 3100 pro UV/Visible (Amersham Biosciences)
Spektralphotometer	NanoDrop 3000 (Thermo Scientific)
PVDF-Transfermembran	Immobilon-P-Transfermembran (Millipore)
qRT-PCR-Gerät	Mx3000P (Stratagene)
Schüttelinkubator	Model G25 (New Brunswick Scientific)
SDS-PAGE-Apparatur	Minigel (Bio-Rad)
	Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)
Sonifiziergerät	Digital Sonifier [®] W-250 D (Branson)
Spannungsquellen	Power Pac (Bio-Rad)
	Consort EV231/EV243 (Roth)
Sterilwerkbank	HeraSafe (Heraeus)
Universalschüttler	SM-30 (Edmund Bühler GmbH)
UV-Tisch	Maxi-UV-Leuchttisch (Peqlab)
Wasserbad	Julabo 5M-5M Bad/Umwälzthermostat (Julabo)
Whatman-Filterpapier	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
Zellkulturinkubator	BBD 6220 (Heraeus)
Zellzähler	CASY Zellzähler (Innovatis)
Zentrifugen	Galaxy MiniStar (VWR International)
	Eppendorf 5417 R (Eppendorf)
	Eppendorf 5425 (Eppendorf)
	Eppendorf 5430 (Eppendorf)

Material

Multifuge 1S-R (Heraeus)

Avanti J-26 XP (Beckman Coulter)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Transformation von *E. coli*-Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmid-amplifikation

Zum Einschleusen von Plasmid-DNA in Bakterien wurden chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s. Es wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C geschüttelt. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Zur Plasmidaufreinigung in größerem Maßstab wurde die Bakteriensuspension direkt in 200 ml antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben. Die LB-Agarplatten oder der Flüssigansatz wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation) wurden 4 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einem Bakterien-Einzelklon angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschließend wurden nacheinander 200 µl Lysepuffer und 200 µl Präzipitationspuffer zugegeben. Nach Zentrifugation (5 min, 20.000 x g, 4 °C) wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Isopropanol beigemischt. Es erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 20.000 x g, 4 °C zur Fällung der DNA. Das DNA-Pellet wurde mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in 30 µl aqua bidest gelöst.

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi-Präparation) wurde mit dem PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die gleichen Puffer wurden auch für die Mini-Präparation verwendet (s. oben). Die aufgereinigte DNA wurde in aqua bidest gelöst, die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert.

3.1.3 Messung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA erfolgte durch Messung der Absorption mit einem Spektralphotometer (NanoDrop, ThermoScientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierüber konnte auch die Reinheit der jeweiligen Nukleinsäure kontrolliert werden.

3.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten oder Chromatin wurde je nach Größe eine 0,8 - 2 %ige (w/v) Agaroselösung in TAE-Puffer aufgekocht, mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und zum Polymerisieren in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, mit dessen Hilfe DNA unter UV-Licht nachgewiesen werden kann. Die jeweiligen DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen des polymerisierten Agarosegels pipettiert. Parallel wurde zum Größenvergleich ein DNA-Größenstandard (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) aufgetragen. Nach etwa einstündiger Auftrennung bei 120 V konnte die DNA auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht werden.

3.1.5 Isolation von RNA

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Säugerzellen erfolgte standardmäßig mit peqGOLD TriFast (Peqlab). Dafür wurde ein Zellpellet in 1 ml TriFast resuspendiert und anschließend 200 µl Chloroform zugegeben. Nach kräftigem Mischen wurde 10 min zentrifugiert (20.000 x g, 4 °C), worauf sich zwei Phasen bildeten. Die obere Phase (etwa 500 µl), welche die RNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde mehrmals invertiert und zur Fällung der RNA 15 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 20.000 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Sobald das Pellet trocken war, wurde es in 10 - 30 µl aqua bidest gelöst.

Alternativ wurde RNA, die für eine Microarray-Analyse (Abschnitt 3.1.8) eingesetzt werden sollte, mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Hierbei erfolgte auf der Säule zusätzlich ein DNase I-Verdau.

3.1.6 cDNA-Synthese

Zur Analyse der Expression einzelner Gene musste die extrahierte RNA mittels Zufallshexanukleotid-Primern und einer reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dafür wurden 0,5 - 2 µg RNA in 10 µl aqua bidest verdünnt. Zur Auflösung der Sekundärstrukturen wurde der RNA-Ansatz für 2 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort 1 min auf 4 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 40 µl cDNA-Syntheseansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur, 50 min bei 37 °C und 15 min bei 70 °C inkubiert.

cDNA-Syntheseansatz:

10 µl M-MLV RT 5 x Puffer (Promega)

5 µl dNTPs (2,5 M, Roth)

2 µl Zufallshexanukleotid-Primer (Roche)

0,2 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas)

1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (Promega)

ad 40 µl aqua bidest

3.1.7 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative PCR wurde sowohl zur Analyse der Genexpression als auch der Anreicherung von DNA nach einer Chromatin-Immunpräzipitation (Abschnitt 3.3.9) verwendet. Hierbei wird die jeweilige DNA amplifiziert und dies durch Zugabe eines

interkalierenden Farbstoffs (SYBRGreen) in Echtzeit quantifiziert (Deepak et al, 2007). Dafür wurden 19 µl des qRT-PCR-Reaktionsansatzes in entsprechende Reaktionsgefäße vorgelegt und 1 µl der cDNA zugegeben. Chromatin-immunpräzipitierte DNA wurde vorher 1:10 verdünnt und entsprechend 10 µl der DNA mit 10 µl des Reaktionsansatzes gemischt.

qRT-PCR-Reaktionsansatz:

5 µl SYBRGreen Mix (ThermoScientific)

0,5 µl Primer 1 (10 µM)

0,5 µl Primer 2 (10 µM)

13 µl aqua bidest (4 µl für ChIP)

PCR-Temperaturprofil:

1 Zyklus	95 °C	15 min
38 Zyklen	95 °C	60 s
	60 °C	20 s
	72 °C	15 s
1 Zyklus	95 °C	60 s
	60 °C	30 s
	95 °C	30 s

Die Messung erfolgte standardmäßig in Triplikaten und zum Ausschluss von unspezifischen Amplifikationen wurde zusätzlich eine Negativkontrolle gemessen, die Wasser anstelle von cDNA enthält. Zur Auswertung wurde der C_t-Wert (*Cycle over threshold*, Schwellenwert-Zyklus) anhand der Amplifikationskurven bestimmt, mit dessen Hilfe die Menge an

vorhandener DNA berechnet werden kann. Bei einer Genexpressionsanalyse wurden zur Normalisierung die Gene *ACTB*, *B2M* oder *RPS14* verwendet.

3.1.8 Microarray

Für eine genomweite Expressionsanalyse (Microarray) wurde die isolierte RNA (s. Abschnitt 3.1.5) mit dem StdSens Experion RNA Chip (Bio-Rad) quantifiziert. Hiermit konnte gleichzeitig die Qualität geprüft werden. Es folgte die Markierung der RNA-Proben mit dem Farbstoff Cy5 mit dem Two-color Quick Amp Labeling Kit (Agilent) nach Herstellerangaben. Zusätzlich wurde eine Referenz-Probe benötigt, die zu gleichen Teilen aus allen analysierten RNA-Proben bestand und mit Cy3 markiert wurde. Die anschließende Hybridisierung der Cy5-markierten Proben erfolgte zusammen mit der Referenz-Probe auf einem 44K Whole Human Genome Array G4845A 026652 (Agilent). Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem DNA microarray scanner G2505C (Agilent) mit einer Auflösung von 5 µm und 20 bit und der Feature Extraction 10.1.1.1 Software (Agilent) detektiert und ausgewertet.

3.2 Zellbiologische Methoden

Säugerzellen wurden in einem Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert.

3.2.1 Passagieren von Zellen

Adhärenente Zellen wurden je nach Proliferationsrate mehrmals wöchentlich vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Dafür wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und eine entsprechende Menge Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach wenigen Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt und von der Schale gelöst. Ein Teil der Zellen wurde zur weiteren Kultivierung in eine neue Kulturschale überführt, der Rest wurde verworfen. Sollten die Zellen für einen Versuch ausgesät werden, konnte die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer oder eines Zellzählers (CASY)

bestimmt werden. Dabei variierte die verwendete Zellzahl je nach Art und Dauer des Experiments. Es wurde immer darauf geachtet, dass die Zellen zum Ende des Versuchs nicht konfluent wurden.

3.2.2 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen aus dem Stickstofftank wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in ein Reaktionsgefäß mit 30 ml Kulturmedium überführt und mehrfach invertiert. Um das DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen, wurden die Zellen für 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer entsprechenden Menge frischen Mediums aufgenommen und die Zellsuspension auf eine neue Kulturschale zur Kultivierung gegeben.

3.2.3 Einfrieren von Zellen

Um Zellen in Flüssigstickstoff für eine längere Zeit aufzubewahren, wurden diese wie bereits beschrieben mit Trypsin-Lösung von der Kulturschale abgelöst und in Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in einem adäquaten Volumen Einfriermedium resuspendiert und jeweils 1 ml der Suspension in ein Kryoröhrchen pipettiert. Dieses wurde in einem Einfrierbehälter einen Tag bei -80 °C gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff überführt.

3.2.4 Transfektion von Säugerzellen mit Polyethylenimin (PEI)

Die Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI, Sigma). Dafür wurden Zellen 24 h vor Transfektion ausplattiert und kurz vorher ein Mediumwechsel auf Transfektionsmedium (2 % FBS, ohne Antibiotika) durchgeführt. Es wurden folgende zwei Transfektionsansätze vorbereitet:

x µg DNA	x µl PEI
500 µl PBS	500 µl PBS

Dabei wurde ein DNA:PEI-Verhältnis von 1:2 verwendet. Beide Ansätze wurden im Anschluss gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA-PEI-Mischung daraufhin direkt auf die Zellen gegeben. Nach 4 - 12 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Transfektionsmedium durch normales Kulturmedium ersetzt. 24 - 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für die weitere Analyse geerntet.

3.2.5 Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamine™ 2000

Alternativ zur Transfektion mit PEI wurde für bestimmte Plasmide und Zelllinien eine Lipid-basierte Transfektion durchgeführt. Hierfür wurden Zellen auf 10 cm Kulturschalen in Antibiotika-freiem Medium ausplattiert. Für die Transfektion wurden 10 - 20 µg DNA bzw. die entsprechende Menge Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) in jeweils 500 µl Opti-MEM® (Life Technologies) verdünnt. Beide Ansätze wurden miteinander gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde anschließend auf die Zellen gegeben und 24 - 30 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet.

3.2.6 Herstellung von Retroviren in Phoenix-Zellen

Die Verpackungszelllinie Phoenix-Eco (Phx) wurde zur Herstellung von rekombinanten Retroviren verwendet, mit deren Hilfe Proteine depletiert wurden. Sie stammt von der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T ab, welche mit E1A und dem T-Antigen transformiert wurde (Kinsella & Nolan, 1996). Phx-Zellen exprimieren die viralen Proteine gag, pol und env, welche zur Verpackung der Viruspartikel nötig sind.

Für die Virusproduktion wurden pro 10 cm Kulturschale 2 Mio. Phx-Zellen ausplattiert und am folgenden Tag mit 10 - 20 µg entsprechender Plasmid-DNA (pRetroSuper-Vektor) mit Hilfe von PEI transfiziert (s. Abschnitt 3.2.4). 4 - 6 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Die Phx-Zellen beginnen nun Virus zu produzieren und geben diesen in das

Kulturmedium ab. Der erste Virusüberstand wurde 48 h nach Transfektion abgenommen. Es wurde frisches Medium zu den Phx-Zellen gegeben und nach weiteren 24 h zum zweiten Mal das virushaltige Medium gesammelt. Der komplette Virusüberstand wurde filtriert und entweder sofort verwendet oder bei -80 °C zur langfristigen Lagerung eingefroren.

3.2.7 Retrovirale Infektion von Säugerzellen

Zur retroviralen Infektion wurde das Moloney Murine Leukämievirus (MoMuLV) verwendet, das nur Maus- bzw. Rattenzellen infizieren kann. Daher mussten humane Zelllinien vor der Infektion mit dem murinen ekotrophen Rezeptor transfiziert werden.

Für die Infektion wurde das Medium von ausplattierten Zellen entfernt und pro 10 cm Kulturschale wurden 2 ml Medium, 3 ml Virusüberstand und 4 µg/ml Polybren auf die Zellen gegeben. Nach 16 h Inkubation wurden 5 ml normales Medium hinzugefügt und insgesamt 48 h nach Infektion konnte durch Zugabe von 2 µg/ml Puromycin mit der Selektion begonnen werden. Eine erfolgreiche Selektion wurde durch Puromycin-Behandlung von nicht-infizierten Zellen kontrolliert. Nach 2 - 3 Tagen Selektion wurden die infizierten Zellen geerntet oder für weiterführende Experimente ausgesät.

3.2.8 Herstellung von Lentiviren in HEK293T-Zellen

Alternativ zur retroviralen Infektion wurden für die Depletion von Proteinen auch Lentiviren benutzt, da diese eine wesentlich höhere Infektionseffizienz besitzen und für die Infektion humaner Zellen kein ekotropher Rezeptor nötig ist. Hierbei mussten zusätzlich die zur Virusverpackung nötigen Plasmide (psAX.2 und pMD2.G) transfiziert werden. Für die Lentivirusproduktion wurden pro 10 cm Kulturschale 4,5 Mio. HEK293T-Zellen ausplattiert und diese mittels PEI transfiziert. Dafür wurde folgender Transfektionsansatz vorbereitet:

11,1 µg Plasmid-DNA (pLKO.1-Vektor)

2,4 µl psAX.2

1,2 µl pMD2.G

500 µl Opti-MEM®

Ein Mediumwechsel erfolgte 16 h nach Transfektion auf 6 ml normales Kulturmedium. Es wurde insgesamt dreimal der Virusüberstand abgenommen (36 h, 48 h und 60 h nach Transfektion), wonach jeweils 6 ml neues Medium zugegeben wurde. Der komplette Virusüberstand wurde anschließend filtriert und entweder sofort verwendet oder bei -80 °C zur langfristigen Lagerung eingefroren.

3.2.9 Lentivirale Infektion von Säugerzellen

Für die lentivirale Infektion wurde das Medium von ausgesäten Zellen abgenommen. Pro 10 cm Kulturschale wurden 3,5 ml Medium, 500 µl Virusüberstand und 4 µg/ml Polybren auf die Zellen gegeben. Nach 16 - 24 h erfolgte eine zweite Infektion. 48 h nach der ersten Infektion konnte durch Zugabe von 2 µg/ml Puromycin mit der Selektion begonnen werden. Eine erfolgreiche Selektion wurde durch Puromycin-Behandlung von nicht-infizierten Zellen kontrolliert. Nach 1 - 2 Tagen Selektion wurden die infizierten Zellen geerntet oder für weiterführende Experimente ausplattiert.

3.2.10 Behandlung von Zellen mit UV-Strahlung

Zur Behandlung von Zellen mit UV-Strahlung (UVB, Wellenlänge 312 nm) wurde das Medium entfernt und die Kulturschale ohne Deckel unter der UV-Lampe 1 min (500 J/m²) bestrahlt. Darauf wurde das Medium wieder zugegeben und die Zellen zu entsprechenden Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet.

3.2.11 Wachstumskurve

Um die Proliferation unterschiedlich behandelter Zellen zu vergleichen, wurden für jeden Tag der Zellzählung jeweils 10.000 Zellen in Triplikaten in 6-well-Platten ausgesät. Die Zellen

wurden anschließend mit Trypsin-Lösung abgelöst und mittels Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt. Dies erfolgte je nach Experiment über 4 oder 5 Tage.

3.2.12 BrdU-Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (BrdU-PI-FACS)

Zur Zellzyklusanalyse wurde die Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) angewendet. Hierbei kann der DNA-Gehalt (N) der Zellen mit Hilfe eines interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffs wie Propidiumiodid (PI) analysiert werden. Der DNA-Gehalt wiederum ermöglicht eine Unterscheidung der Zellzyklusphasen G1/G0 (2 N), S ($> 2\text{ N}$, $< 4\text{ N}$) und G2/M (4 N). Darüber hinaus können sowohl polyploide Zellen ($> 4\text{ N}$) als auch apoptotische Zellen (SubG1, $< 2\text{ N}$) identifiziert werden. Vor der Ernte wurden die Zellen 1 h mit 5 µg/ml Bromdesoxyuridin (BrdU) behandelt. Als Thymidin-Analogon wird dieses in neu synthetisierte DNA eingebaut und dient damit als Maß für die Proliferationsrate der Zellen. Zur Analyse bereits abgelöster, apoptotischer Zellen wurde das Medium in 15 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und die adhären Zellen mit Trypsin-Lösung von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden im vorher gesammelten Mediumüberstand aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C). Nach einmaligem Waschen mit 10 ml PBS und erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend langsam unter Vortexen in 4 ml eiskaltes Ethanol abgetropft. Die so fixierten Zellen wurden mindestens 24 h bei -20 °C gelagert. Am Tag der FACS-Analyse wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C), mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml 2 M HCl/0,5 % (v/v) Triton X-100 aufgenommen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur zur Denaturierung der DNA, woraufhin die Zellen pelletiert wurden (10 min, 400 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml 0,1 M Na₂B₄O₇ (pH 8,5) resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C). Nach Zugabe von 100 µl 1 % (w/v) BSA in PBS-T wurden 20 µl BrdU-FITC-Antikörper zugegeben und 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C), mit 200 µl 1 % (w/v) BSA in PBS-T gewaschen und in 400 µl Natriumcitrat (38 mM) aufgenommen. Es wurden 15 µl Propidiumiodid-Lösung (1 mg/ml) und 1 µl RNase A (10 mg/ml) hinzugefügt und diese Mischung 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Überführung in FACS-Röhrchen wurden die Proben am Durchflusszytometer (FACSCanto II, BD Biosciences) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und mit einem 556 nm Langpass- und einem 585/42 nm Bandpassfilter für

Propidiumiodid (Emission 617 nm) gemessen. Die Analyse der Zellzyklusverteilung wurde mit dem Programm BD FACSDiva 6.1.2 durchgeführt.

3.2.13 Kristallviolettffärbung

Zur Färbung von adhärenenten Zellen auf einer Kulturschale wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Fixierung mit 70 % (v/v) Ethanol für 10 min, woraufhin das Ethanol entfernt wurde. Nach Trocknung der Zellen wurden diese mit Kristallviolettlösung (2 ml pro 6 cm Kulturschale) für 30 min gefärbt. Danach wurde die Färbelösung verworfen, die Zellen mit aqua bidest gewaschen und anschließend getrocknet.

3.2.14 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Färbung

Senescente Zellen können mit Hilfe der Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) gefärbt werden, welche in diesen Zellen akkumuliert (Dimri et al, 1995). Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von β -Galaktosiden zu Monosacchariden. Zur Färbung wird das chromogene Substrat X-Gal eingesetzt, das nach Spaltung durch die β -Galaktosidase einen blauen Farbstoff bildet.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 5 min mit 2 % (v/v) Formaldehyd/0,2 % (v/v) Glutardialdehyd in PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die SA- β -Gal-Färbelösung auf die Zellen gegeben, die Kulturschalen mit Parafilm abgedichtet und für 12 - 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Blaufärbung der Zellen wurde unter dem Mikroskop dokumentiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten

Für die Isolation von Proteinen aus adhärenenten Säugerzellen wurden diese mit PBS gewaschen und von der Kulturschale geschabt. Nach Zentrifugation (4 min, 800 x g, 4 °C) wurde das Zellpellet in einer entsprechenden Menge RIPA-Lysepuffer (versetzt mit

Proteaseinhibitoren, 1:1.000) resuspendiert und diese Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde daraufhin zentrifugiert (10 min, 20.000 x g, 4 °C) und der Proteinüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (s. Abschnitt 3.3.3) und das Lysat entweder direkt für eine weitere Analyse eingesetzt oder in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Fraktionierung

Eine Fraktionierung wurde durchgeführt, um zelluläre Proteine in lösliche und chromatin-assoziierte Fraktionen aufzuteilen. Hierfür wurde das Zellpellet zunächst in 80 µl Fraktionierungspuffer A (mit Proteaseinhibitoren) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation (1.300 x g, 4 °C) wurde der Überstand, welcher die zytoplasmatischen Proteine enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde mit 500 µl Fraktionierungspuffer A gewaschen und danach in 60 µl Fraktionierungspuffer B (mit Proteaseinhibitoren) aufgenommen. Nach Inkubation auf Eis für 5 min wurde erneut zentrifugiert (5 min, 1.700 x g, 4 °C) und dieser Überstand mit nukleoplasmatischen Proteinen mit dem ersten Überstand zusammengeführt. Dies entspricht der löslichen Proteinfraction. Das verbleibende Pellet, das aus nukleären chromatin-gebundenen Proteinen besteht, wurde in 140 µl 3 x SDS-Probenpuffer aufgekocht (95 °C, 10 min). Von der löslichen Proteinfraction konnten anschließend die Konzentration und das Volumen an eingesetztem Protein für die weitere Analyse bestimmt werden. Eine diesem Volumen entsprechende Menge der chromatin-assoziierten Fraktion wurde parallel verwendet.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde mit der Bradford-Methode durchgeführt (Bradford, 1976). Dazu wurde ein Gemisch aus 500 µl aqua bidest und 500 µl Bradford-Lösung in eine Küvette vorgelegt. Es wurde 1 µl des Proteinlysates hinzugegeben, kräftig gemischt und die Absorption im Photometer bei 595 nm gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 1 µl des jeweiligen Lysepuffers. Die erhaltenen Absorptionswerte konnten mit einer Eichgerade verglichen und somit die Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinlysaten (Laemmli, 1970). Dazu wurden 10 - 20 µg Proteinlysate auf ein einheitliches Volumen mit dem jeweiligen Lysepuffer aufgefüllt und ein halbes Volumen 3 x SDS-Probenpuffer hinzugefügt. Alternativ wurde eine entsprechende Menge eines Eluates einer Immunpräzipitation oder einer Ubiquitinierungsuntersuchung eingesetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei 95 °C inkubiert und direkt in die Geltaschen eines SDS-Polyacrylamid-Gels gefüllt. Das Gel bestand aus einem 4 %igen Sammelgel und je nach Größe der aufzutrennenden Proteine aus einem 7,5 - 15 %igen Trenngel. Als Größenvergleich diente ein Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas oder HiMark™ Pre-Stained HMW Protein Standard, Invitrogen), welcher parallel aufgetragen wurde. Die Gelelektrophorese wurde in einer mit SDS-Laufpuffer befüllten SDS-PAGE-Apparatur durchgeführt. Bis zum Erreichen des Trenngels erfolgte dies bei 80 V, die Auftrennung der Proteine anschließend bei 130 V für etwa 90 min.

3.3.5 Western Blot

Im Western Blot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, mit der anschließend spezifische Färbungen durchgeführt werden können. Dies erfolgte mittels Tank-Blot-Verfahren. Dazu wurde die Membran 1 min in Methanol inkubiert, in aqua bidest gewaschen und darauf in Tank-Blot-Puffer äquilibriert. Die Membran wurde auf das Polyacrylamid-Gel gelegt und zwischen Filterpapieren und Schwämmen in die Tank-Blot-Apparatur gespannt. Der Transfer erfolgte je nach Proteingröße bei 250 - 350 mA für 3 h bei 4 °C. Im Anschluss wurde die Membran in Blockierungslösung für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt, bevor sie über Nacht bei 4 °C in einer entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers in Blockierungslösung rotierend inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in 1 x TBS-T wurde die Membran für 1 h in Sekundärantikörper inkubiert (1:5.000 in 1 x TBS-T), woraufhin nochmals drei Waschschritte in 1 x TBS-T folgten. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Chemilumineszenz mittels Immobilon Western Substrat (Millipore) nach Herstellerangaben. Die Signale wurden mit dem LAS-4000 (Fujifilm Global) visualisiert und konnten gegebenenfalls mit der MultiGauge Software bearbeitet und quantifiziert werden.

3.3.6 Strippen von PVDF-Membranen

Zur Detektion weiterer Proteine auf einer bereits verwendeten PVDF-Membran mussten die gebundenen Antikörper entfernt werden. Dafür wurde die Membran erneut kurz in Methanol geschwenkt, in aqua bidest gewaschen und anschließend 2 h bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 x TBS-T wurde wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben vorgegangen.

3.3.7 Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in 500 µl TNN-Lysepuffer (mit Proteaseinhibitoren) lysiert und im Anschluss mit einem Ultraschallgerät (Branson) im Wasser-Eis-Bad sonifiziert (Sonifizierungszeit 20 s, 5 s Puls/10 s Pause, Amplitude 20 %). Nach Zentrifugation (20.000 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand in eine neues Reaktionsgefäß überführt und davon 10 % Input abgenommen. Dieser wurde mit 3 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und bis zur späteren Analyse bei -20 °C gelagert. Der restliche Überstand wurde pro IP auf 500 µl mit TNN-Lysepuffer aufgefüllt. Für das *preclearing* wurden sowohl 50 µl 10 % (w/v) BSA in TNN-Lysepuffer als auch 50 µl Protein A- oder G-Sepharose-*beads* (gewaschen in TNN-Lysepuffer) zugegeben und dieser Ansatz 2 h bei 4 °C rotiert. Der Überstand nach Zentrifugation (20.000 x g, 20 s, 4 °C) wurde in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben und zur Immunpräzipitation wurde 1 µg Antikörper hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen in TNN-Lysepuffer (einmal mit zusätzlich 200 mM NaCl) wurden 25 - 40 µl 2 x SDS-Probenpuffer auf die *beads* gegeben. Durch 10-minütiges Aufkochen bei 95 °C wurden die präzipitierten Proteine von den *beads* eluiert und konnten zusammen mit der Input-Probe im Western Blot analysiert werden.

3.3.8 *In vivo* Ubiquitinierungsuntersuchung

Zur Identifikation Ubiquitin-modifizierter Proteine wurde eine *in vivo* Ubiquitinierungsuntersuchung durchgeführt. Dabei wurden His₆-Ubiquitin-markierte Proteine über Ni-NTA-Agarose-*beads* aufgereinigt und im Western Blot analysiert. Zellen wurden mit

den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert (Myc oder Mcl1 als Substrat, HA-Huwe1 als E3-Ligase, His-Ubiquitin) und 30 h nach Transfektion geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und 100 µl davon als Input abgenommen. Dieser wurde mit 50 µl 3 x SDS-Probenpuffer 10 min bei 95 °C aufgeköcht und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Die verbleibenden Zellen wurden in 1 ml Ubi-Lysepuffer A (versetzt mit Proteaseinhibitoren, 10 µM MG-132, 5 mM NEM) lysiert. Es folgte eine Sonifikation wie in Abschnitt 3.3.7 beschrieben mit anschließender Zentrifugation (20.000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl Ni-NTA-Agarose-*beads* über Nacht bei 4 °C rotiert. Anschließend wurde der Ansatz mit je 1 ml Puffer wie folgt gewaschen: 1 x Ubi-Lysepuffer A, 1 x Ubi-Lysepuffer A/Ubi-Puffer B (im Verhältnis 1:4), 1 x Ubi-Puffer B. Der verbleibende Überstand wurde von den *beads* abgenommen und diese mit 40 - 50 µl 2 x SDS-Probenpuffer (mit 200 mM Imidazol) 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Dadurch wurden die His₆-Ubiquitin-modifizierten Proteine von den *beads* gelöst und konnten nachfolgend zusammen mit dem Input für einen Western Blot eingesetzt werden.

3.3.9 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) dient dem Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen. Dabei werden DNA-bindende Proteine und DNA mit Hilfe von Formaldehyd vernetzt und das Chromatin aus den Zellen fragmentiert. Die Protein-gebundenen Chromatinfragmente werden mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Im Anschluss kann die Anreicherung bestimmter DNA-Sequenzen mit spezifischen Primern in einer qRT-PCR analysiert werden.

Chromatinpräparation

Zur Quervernetzung von Proteinen und DNA wurden Zellen mit 1 % Formaldehyd für 10 min bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen dieser Reaktion wurden die Zellen mit 125 mM Glycin für 5 min bei 37 °C behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen von den Kulturschalen geschabt und pelletiert.

Die Zellpellets wurden im Anschluss in 3 ml ChIP-Lysepuffer I mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (800 x g, 5 min, 4 °C) wurde

der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellkerne in 1 ml ChIP-Lysepuffer II mit Proteaseinhibitoren für weitere 10 min lysiert. Daraufhin wurde das Chromatin mit Hilfe eines Ultraschallgeräts fragmentiert (Sonifizierungszeit 15 min, 10 s Puls/30 s Pause, Amplitude 30 %). Während des Sonifizierens wurde das Zelllysat ständig in einem Eiswasser-Ethanol-Bad gekühlt. Die Chromatinlösung wurde 15 min bei 20.000 x g und 4 °C abzentrifugiert und der chromatinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Chromatin konnte zur langfristigen Lagerung bei -80 °C eingefroren werden.

Kontrolle der Chromatin-Fragmentgröße

Um sicherzustellen, dass eine korrekte Fragmentgröße des Chromatins zwischen 150 und 500 bp erreicht wurde, wurden 25 µl des sonifizierten Chromatins mit 475 µl TE gemischt. Es wurden 16 µl NaCl (5 M) und 1 µl RNase A (1 mg/ml) hinzugefügt und 1 h bei 37 °C und anschließend mindestens 6 h bei 65 °C leicht schüttelnd inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl EDTA (500 mM) und 10 µl Proteinase K (1 mg/ml) wurde der Ansatz erneut 2 h bei 45 °C geschüttelt. Zur Aufreinigung der DNA wurde das GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) verwendet, wobei die DNA in zweimal 25 µl aqua bidest eluiert wurde. Im Anschluss wurden 20 µl der DNA mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen, um die Fragmentgröße abzuschätzen.

Blockieren der Sepharose-beads und preclearing des Chromatins

Vor der Verwendung wurden Protein A- oder Protein G-Sepharose-beads einmal mit ChIP-Lysepuffer II gewaschen und mindestens 6 h rotierend bei 4 °C mit 400 µg/ml Lachssperma-DNA (Invitrogen) und 1 mg/ml BSA in TE blockiert. Die beads wurden pelletiert (800 x g, 5 min, 4 °C) und in einem Volumenanteil ChIP-Lysepuffer II aufgenommen.

Um unspezifisch an die Sepharose-beads bindendes Chromatin zu entfernen, wurde zunächst ein *preclearing* durchgeführt. Die Konzentration des sonifizierten Chromatins wurde mit der Bradford-Methode (Abschnitt 3.3.3) bestimmt und pro IP wurden 300 µg Chromatin eingesetzt. Ein Ansatz wurde auf 500 µl mit ChIP-Lysepuffer II aufgefüllt und 60 µl Sepharose-beads hinzugefügt. Es wurde mindestens 6 h oder über Nacht rotierend bei 4 °C inkubiert. Der so aufbereitete Chromatin-Ansatz konnte für die Immunpräzipitation eingesetzt werden.

Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden 4 µg spezifischer Antikörper (soweit die Konzentration bekannt) zum vorgereinigten Chromatin-Ansatz gegeben und über Nacht bei 4 °C rotiert. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde immer eine Probe mit 4 µg IgG-Kontrollserum mitgeführt. Anschließend wurden 60 µl blockierte Sepharose-*beads* hinzugefügt und für weitere 4 - 6 h unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Die *beads* wurden anschließend zweimal mit je 1 ml ChIP-Waschpuffer I, II und III gewaschen, die Zentrifugation dazwischen erfolgte für 20 s bei 20.000 x g und 4 °C. Der letzte Waschschrift wurde mit 1 ml TE ausgeführt. Zur Elution wurden in zwei Schritten je 150 µl ChIP-Elutionspuffer hinzugefügt und 15 min bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert.

Reversion, Aufreinigung und Analyse der immunpräzipitierten DNA

Nach der Elution wurden beide Eluate vereinigt. Als Input-Probe wurde 1 % des Chromatins abgenommen und mit 300 µl Elutionspuffer gemischt. Sowohl Eluat als auch Input-Probe wurden mit 14 µl Tris (0,5 M, pH 6,5), 1,2 µl NaCl (5 M) und 1 µl RNase A (1 mg/ml) 1 h bei 37 °C und anschließend bei 65 °C über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 3,5 µl EDTA (500 mM) und 7 µl Proteinase K (1 mg/ml) folgte eine 2-stündige Inkubation bei 45 °C. Dadurch wurde die Protein-DNA-Vernetzung aufgelöst und sowohl RNA als auch Proteine abgebaut. Die Aufreinigung wurde mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach zweimaliger Elution mit je 25 µl aqua bidest wurde die DNA mit 450 µl aqua bidest verdünnt und 10 µl davon für die anschließende qRT-PCR (s. Abschnitt 3.1.7) eingesetzt. Dabei wurde die Anreicherung bestimmter chromosomaler Bereiche mit spezifischen Primern analysiert. Der C_t-Wert der Input-Probe wurde vom jeweiligen C_t-Wert der immunpräzipitierten DNA subtrahiert, sodass die Anreicherung als prozentualer Anteil dargestellt wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung von Huwe1 als potentielles Zielprotein einer Tumorthherapie

4.1.1 Die Depletion von Huwe1 führt zum Proliferationsarrest verschiedener Kolonkarzinomzelllinien

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob über die Inaktivierung von Huwe1 eine tumorzellspezifische Inhibition der Myc-Funktion erzielt werden kann. Zur Validierung von Huwe1 als potentielles Zielprotein einer Tumorthherapie im Kolonkarzinom wurde die Proliferation der kolorektalen Tumorzelllinie Ls174T nach Depletion von Huwe1 getestet. In diesen Zellen ist Myc sowohl für die Aufrechterhaltung der Proliferation als auch für die Hemmung der Differenzierung essentiell (van de Wetering et al, 2002). Für die Depletion von Huwe1 wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, mit deren Hilfe konstitutiv zwei verschiedene shRNA-Sequenzen (shHuwe1-1 und shHuwe1-2) gegen Huwe1 exprimiert wurden. Beide shRNAs verringerten sowohl die Protein- als auch mRNA-Menge von Huwe1 um ein Vielfaches (Abb. 4.1 A). Dabei war zu bemerken, dass shHuwe1-1 eine stärkere Depletion von Huwe1 bewirkte als shHuwe1-2. In der Kristallviolett-färbung zeigt sich, dass Huwe1-depletierte Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen langsamer proliferierten (Abb. 4.1 B). Dieser Arrest korrelierte zudem mit der Effizienz der Huwe1-Depletion: shHuwe1-1 induzierte einen stärkeren Proliferationsstop als shHuwe1-2.

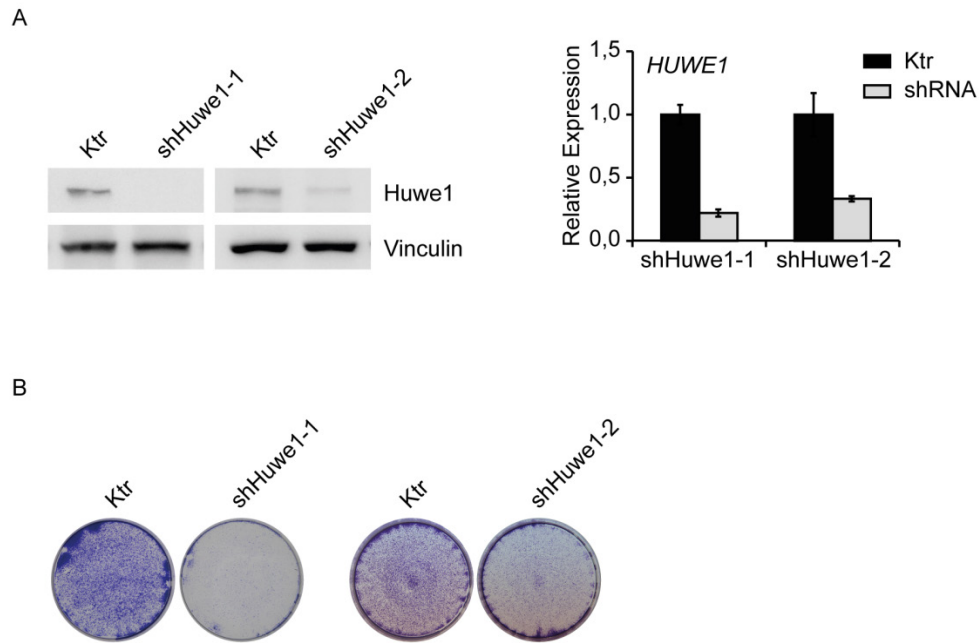


Abb. 4.1 Die Depletion von Huwe1 in Ls174T-Zellen führt zum Proliferationsarrest¹

(A) Protein- und mRNA-Mengen von Huwe1 nach Huwe1-Depletion. Ls174T-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die entweder für eine shRNA gegen Huwe1 kodieren oder als Kontrolle gegen eine unspezifische Sequenz gerichtet sind (Ktr). Nach Selektion wurde die Depletion von Huwe1 auf Proteinebene im Western Blot untersucht (links). Als Ladekontrolle diente Vinculin. Parallel wurde RNA isoliert und die Expression von *HUWE1*, normalisiert auf *B2M*, mittels qRT-PCR analysiert (rechts). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=5; soweit im weiteren Verlauf der Arbeit nicht anders angegeben, bezeichnet n die Anzahl voneinander unabhängiger biologischer Replikate).

(B) Kristallviolettffärbung von Ls174T-Zellen nach Depletion von Huwe1.

Auch in drei weiteren Kolonkarzinomzelllinien konnte die Huwe1-Expression mittels shRNA herunterreguliert werden (Abb. 4.2 A). Aus der Kristallviolettffärbung ist ersichtlich, dass die Depletion von Huwe1 in diesen Zellen ebenfalls einen Proliferationsarrest induzierte (Abb. 4.2 B).

¹ Diese Abbildungen wurden in ähnlicher Form in (Peter et al, 2014, in Revision) zur Veröffentlichung eingereicht (s. auch die folgenden Seiten).

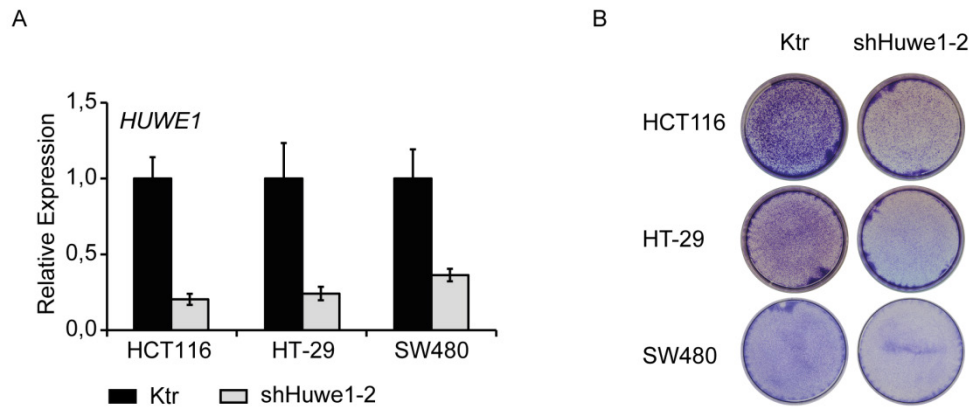


Abb. 4.2 Die Huwe1-Depletion induziert einen Proliferationsarrest in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien¹

(A) Expression von *HUWE1* nach konstitutiver Depletion in HCT116, HT-29 und SW480. Die Zellen wurden mit Kontrollentiviren (Ktr) oder Lentiviren mit einer shRNA gegen Huwe1 infiziert. Nach Selektion wurde die RNA isoliert und die mRNA-Menge von *HUWE1* in einer qRT-PCR gemessen. Die Expression wurde auf *B2M* oder *ACTB* normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen technischer Triplikate eines repräsentativen Experiments (n=2).

(B) Kristallviolettgefärbung von HCT116, HT-29 und SW480 nach Huwe1-Depletion. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt.

4.1.2 Die induzierbare Huwe1-Depletion hemmt das Wachstum subkutaner und orthotoper Tumore

Zur Validierung der Effekte einer Huwe1-Depletion *in vivo* wurde ein System von Ls174T-Zellen mit einer Doxyzyklin-induzierbaren shRNA gegen Huwe1 generiert. Hierfür wurde die schon im vorangegangenen Abschnitt erwähnte shHuwe1-1 verwendet. Die Daten wurden freundlicherweise von Jennyfer Bultinck zur Verfügung gestellt. Nach Doxyzyklin-induzierter Huwe1-Depletion wurde ein Proliferationsarrest nachgewiesen (Jennyfer Bultinck, persönliche Mitteilung). Die Zellen wurden daraufhin subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert und sobald die Tumore angewachsen waren, wurde den Mäusen Doxyzyklin über das Trinkwasser verabreicht. Die Depletion von Huwe1 konnte mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung in etablierten Tumoren sieben Tage nach Beginn der Doxyzyklinbehandlung validiert werden (Abb. 4.3 A, oben). Zudem zeigten Huwe1-defiziente Tumore eine verringerte BrdU-Inkorporation, womit eine verminderte Proliferationsrate nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.3 A, unten). In Abbildung 4.3 B ist zu erkennen, dass die unbehandelten Tumore über einen Zeitraum von drei Wochen an Größe zunahmen, während die induzierte Depletion von Huwe1 das Wachstum der Tumore

signifikant hemmte. Dieses Resultat konnte auch in einem orthotopen Tumormodell bestätigt werden. Dafür wurden die eben beschriebenen Ls174T-Zellen, die zusätzlich das Enzym Luciferase stabil exprimierten, in das Caecum immundefizienter Mäuse injiziert. Das Tumorwachstum konnte direkt *in vivo* über die Aktivität der Luciferase dokumentiert werden. Die Mäuse, welche einen Primärtumor im Kolon entwickelten, wurden anschließend entweder mit Doxyzyklin behandelt oder unbehandelt gelassen. Abbildung 4.3 C zeigt die Stärke des Luciferasesignals und damit das Wachstum der Tumore (links) und je ein Beispiel des Luciferasesignals einer unbehandelten und einer behandelten Maus (rechts). In unbehandelten Kontrollmäusen war ein kontinuierliches Wachstum der Primärtumore mit nachfolgender Metastasierung in das Peritoneum sowie in die Lymphknoten, Leber und Lunge nachzuweisen. Die Gabe von Doxyzyklin dagegen inhibierte sowohl das Tumorwachstum als auch die Metastasierung.

Daraus konnte geschlossen werden, dass Huw1 sowohl für die Proliferation von Kolonkarzinomzellen als auch für das Tumorwachstum notwendig ist.

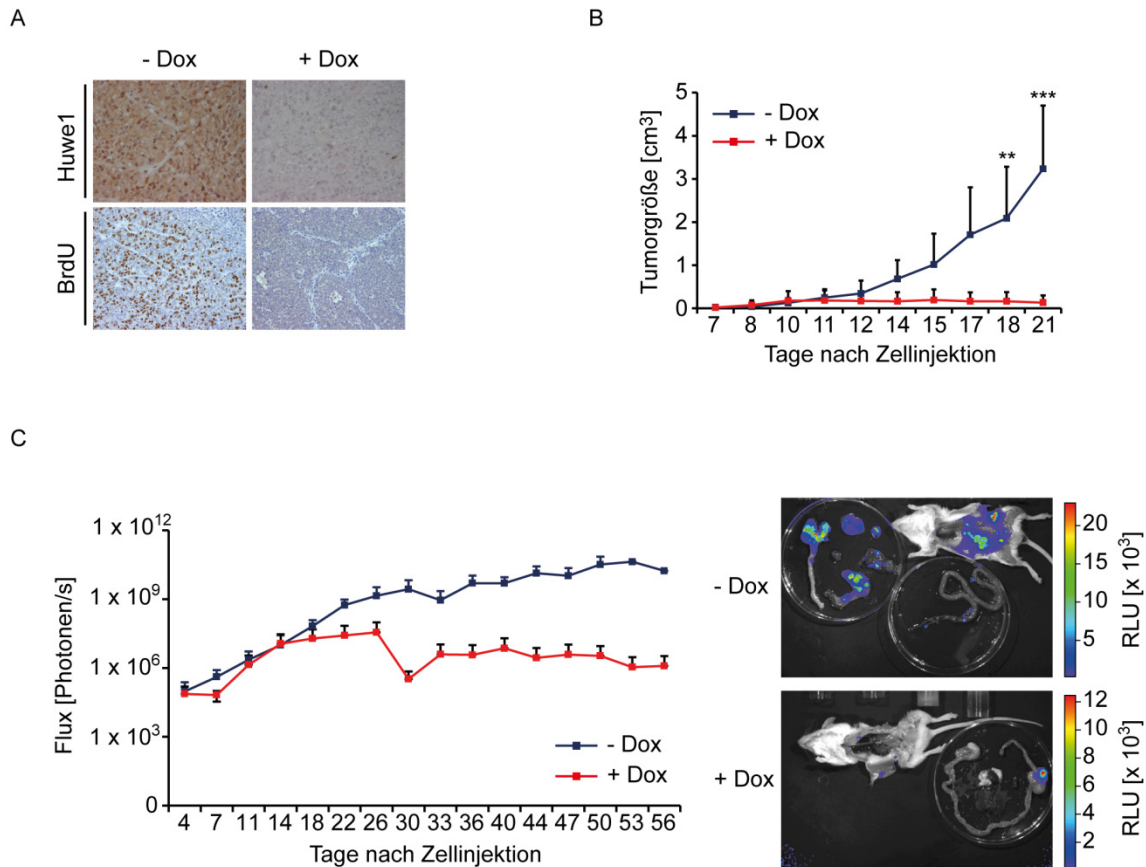


Abb. 4.3 Die Depletion von Huwe1 inhibiert das Tumorwachstum¹

(A) Immunhistochemische Färbung von Huwe1 und BrdU in etablierten subkutanen Tumoren. Ls174T-Zellen mit einer Doxyzyklin-induzierbaren shRNA gegen Huwe1 (shHuwe1-1) wurden subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert. Nach Ausbildung der Tumore (sieben Tage) wurde den Mäusen Doxyzyklin verabreicht (1 mg/ml im Trinkwasser). Sieben Tage nach Beginn der Behandlung wurden die Tumore für eine Huwe1-spezifische immunhistochemische Färbung präpariert. Für die BrdU-Färbung wurde den Mäusen eine Stunde vor Präparation BrdU injiziert.

(B) Wachstum subkutaner Tumore nach Depletion von Huwe1. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt. Das Tumorwachstum wurde über zwei Wochen dokumentiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=5). p-Werte wurden mit Hilfe eines Student's t-Test berechnet (**p-Wert<0,01; ***p-Wert<0,001).

(C) Wachstum orthotoper Tumore nach induzierter Huwe1-Depletion. Ls174T-Zellen wurden orthotop in das Caecum immundefizienter Mäuse injiziert. 14 Tage nach Injektion, wenn alle Mäuse ein abdominales Luciferasesignal zeigten, wurde die Doxyzyklinbehandlung gestartet (1 mg/ml im Trinkwasser). Das Tumorwachstum wurde mittels Luciferase-basiertem *in vivo imaging* dokumentiert (links). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). Am Ende des Experiments wurden die Mäuse präpariert und die Luciferase-Aktivität in verschiedenen Organen aufgenommen. Rechts ist je ein Beispiel einer Doxyzyklin-behandelten und einer unbehandelten Maus gezeigt. RLU: *relative light units*.

4.1.3 Sowohl die konstitutive als auch induzierbare Depletion von Huwe1 reprimiert Myc-aktivierte Zielgene

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Kolonkarzinomzelllinie Ls174T verwendet, da diese Zellen in ihrer Proliferation Myc-abhängig sind und eine eingeschränkte Proliferation nach Huwe1-Depletion zeigten. Deswegen stellte sich die Frage, ob durch Depletion von Huwe1 die Funktion von Myc beeinträchtigt ist. Um dies zu untersuchen, wurde die Expression von Huwe1 mit einer der beiden shRNAs konstitutiv herunterreguliert. Zusätzlich wurden die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Ls174T-Zellen verwendet, welche eine Doxyzyklin-induzierbare shHuwe1 tragen und im subkutanen bzw. orthotopen Tumormausmodell eingesetzt wurden. Damit wurden sowohl die Proteinmenge von Myc als auch die Expression verschiedener Myc-Zielgene nach Huwe1-Depletion untersucht.

Bei konstitutiver Depletion von Huwe1 wurde weder die Protein- noch die mRNA-Menge von Myc beeinflusst (Abb. 4.4 A, B). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Expression mehrerer direkter Myc-aktivierter Gene inhibiert wurde (Abb. 4.4 B, „Myc-induziert“). Darunter befanden sich Gene, die den Zellzyklus regulieren, wie *CCNA2* und *CDC25A*, aber auch Gene, welche Zellzyklus-unabhängige Funktionen besitzen (*HSPE1*, *ODC1*, *NCL*). Dies lässt darauf schließen, dass die Repression der Expression nicht indirekt durch den ausgelösten Proliferationsarrest erfolgte. Im Gegensatz dazu hatte die Depletion von Huwe1 keinen Einfluss auf die Expression sowohl zweier Myc-reprimierter Gene (*CDKN1A*, *GADD45A*) als auch zweier Kontrollgene (*ACTB*, *RPS14*), die nicht durch Myc reguliert werden. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Expression von *MUC2* mehr als achtfach erhöht war. *MUC2* ist ein Differenzierungsmarker in Kolonzellen (van de Wetering et al, 2002), daher korreliert dieses Resultat mit der Beobachtung, dass Myc die Differenzierung in Ls174T-Zellen inhibiert.

Zur induzierbaren Depletion von Huwe1 wurden die Zellen zwei oder vier Tage mit Doxyzyklin behandelt. Nach vier Tagen Behandlung konnte kein Huwe1 im Western Blot nachgewiesen werden, während die Myc-Proteinmenge unverändert blieb (Abb. 4.4 C). Da mit zwei Tagen Doxyzyklin keine vollständige Depletion von Huwe1 erreicht war, wurde die Expressionsanalyse mit vier Tagen Doxyzyklin-Behandlung durchgeführt. Ähnlich wie bei der konstitutiven Depletion wurde auch hier die mRNA-Menge von Myc nicht beeinflusst, während die Expression mehrerer direkter Myc-aktivierter Zielgene reprimiert wurde (Abb. 4.4 D, „Myc-induziert“). Die Expression des Kontrollgens *RPS14* blieb dahingegen

unverändert. Die Ergebnisse zeigen, dass Huwe1 spezifisch für die Transaktivierung von Myc-Zielgenen notwendig ist.

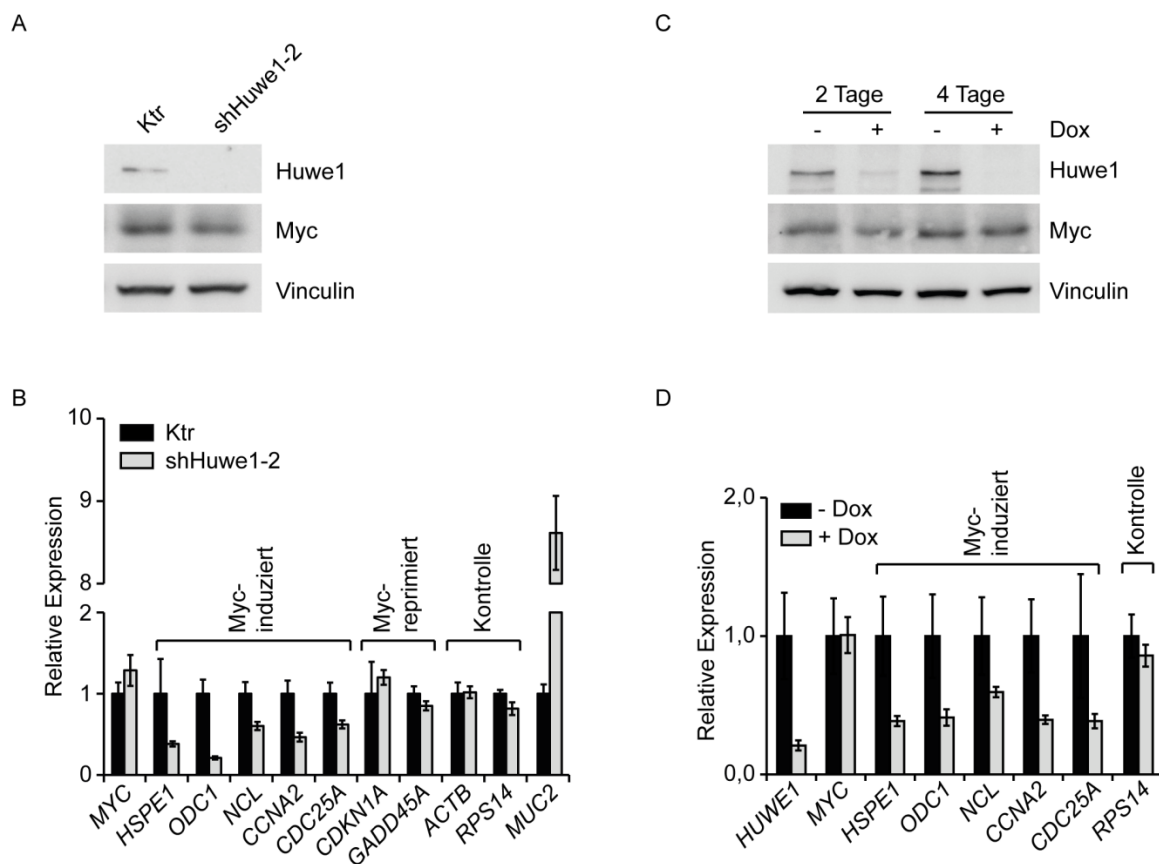


Abb. 4.4 Huwe1 wird für die Transaktivierung von Myc-Zielgenen benötigt¹

(A) Proteinmengen von Huwe1 und Myc nach konstitutiver Depletion von Huwe1. Ls174T-Zellen wurden lentiviral mit einer shRNA gegen Huwe1 oder einem Leervektor als Kontrolle (Ktr) infiziert. Nach Selektion wurde die Expression von Huwe1 und Myc auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert. Vinculin diente als Ladekontrolle.

(B) Expression von Myc-Zielgenen nach konstitutiver Huwe1-Depletion. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt, anschließend die RNA isoliert und die Expression der angegebenen Gene mittels qRT-PCR analysiert. Zur Normalisierung wurde das Gen *B2M* verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=5).

(C) Induzierbare Depletion von Huwe1. Ls174T-Zellen, die eine Doxyzyklin-induzierbare shRNA gegen Huwe1 tragen (shHuwe1-1), wurden mit 1 µg/ml Doxyzyklin (+) oder Ethanol als Kontrolle (-) behandelt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die Proteinlysate im Western Blot auf die Expression von Huwe1 und Myc untersucht. Als Ladekontrolle wurde Vinculin verwendet.

(D) Expression von Myc-Zielgenen nach induzierbarer Depletion von Huwe1. Es wurden dieselben Zellen wie in (C) beschrieben verwendet. Nach vier Tagen Doxyzyklin-Behandlung wurde die RNA isoliert und die Expression der angegebenen Gene mittels qRT-PCR analysiert. Die Expression wurde auf die mRNA-Menge von *B2M* normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=2).

Um zu analysieren, ob Zielgene von Myc auch global durch die Depletion von Huwe1 beeinflusst werden, wurde eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt. Dafür wurde Huwe1 in Ls174T-Zellen mittels lentiviraler Infektion konstitutiv depletiert und die isolierte RNA für einen Microarray (s. Abschnitt 3.1.8) eingesetzt. Nach Depletion von Huwe1 wurden 492 Gene herunterreguliert und 250 Gene hochreguliert. Dabei wurde eine mehr als zweifache Expressionsänderung im Vergleich zur Kontrolle als Schwellenwert angenommen. Mit den Daten wurde anschließend eine *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) durchgeführt, bei der publizierte Gensets mit den Expressionsprofilen der eigenen Daten verglichen werden. Damit konnte untersucht werden, ob die Expressionsdaten nach Huwe1-Depletion ein ähnliches Profil aufweisen wie in bereits bekannten Gensets Myc-induzierter Gene. Abbildung 4.5 (oben) zeigt Beispiele von drei publizierten Myc-induzierten Gensets aus der C2-Gruppe der MSigDB (*Molecular Signature Database*) (Schlosser et al, 2005; Schuhmacher et al, 2001; Zeller et al, 2003). In diesen Gensets war eine statistisch signifikante Anreicherung von Genen zu beobachten, die durch Huwe1-Depletion reprimiert wurden. Im Gegensatz dazu zeigten ausgewählte Beispiele für Myc-reprimierte Gensets keine signifikante Anreicherung von durch Huwe1-Depletion beeinflussten Genen (Abb. 4.5, unten) (Schuhmacher et al, 2001; Yu et al, 2005; Zeller et al, 2003). Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Depletion von Huwe1 auch global die Expression Myc-aktivierter Zielgene inhibiert, aber keinen Einfluss auf Myc-reprimierte Zielgene hat.

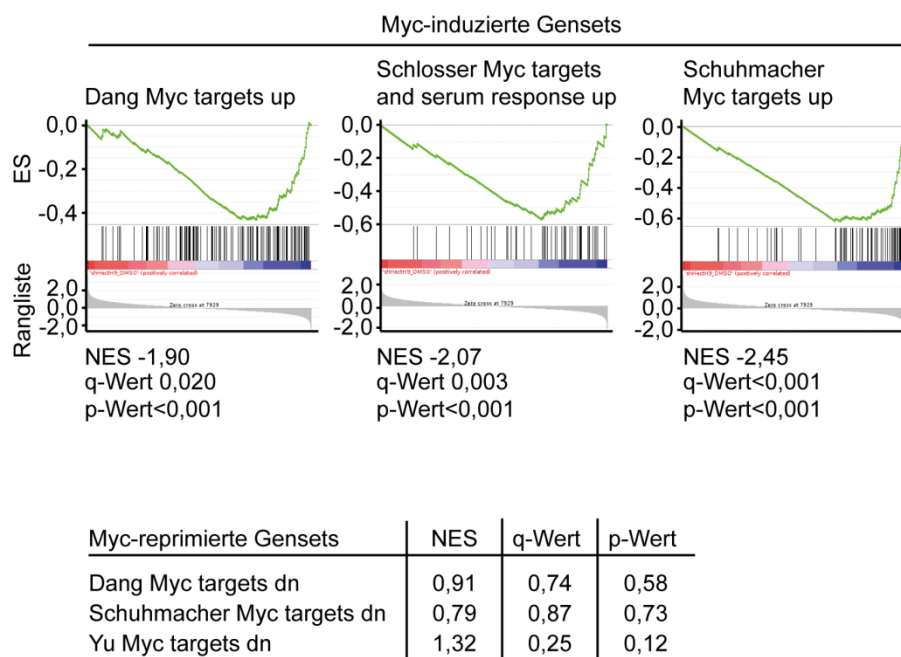


Abb. 4.5 Huwe1 ist essentiell für die globale Transaktivierung von Myc-Zielgenen¹

Effekte der Huwe1-Depletion auf die Expression bereits publizierter Sets von Myc-Zielgenen. Die obere Reihe zeigt Anreicherungsplots einer GSEA-Analyse, welche die Ähnlichkeit von bekannten Myc-induzierten Genen aus der *Molecular Signature Database* (MSigDB) mit den Genen vergleicht, die durch Huwe1-Depletion reguliert werden. Die Tabelle darunter gibt Beispiele von bekannten Myc-reprimierten Gensets an (Schuhmacher et al, 2001; Yu et al, 2005; Zeller et al, 2003). ES: *enrichment score*; NES: *normalised enrichment score*.

4.1.4 Die Effekte der Depletion von Huwe1 sind unabhängig von p53

Neben Myc ist p53 ein wichtiges Substratprotein von Huwe1 (Chen et al, 2005). Huwe1 ubiquitiniert p53, induziert somit dessen Degradierung durch das Proteasom und es wurde beschrieben, dass die Inaktivierung von Huwe1 p53 stabilisiert (s. Abschnitt 1.5.4). Aus diesem Grund sollte zum einen geklärt werden, ob im hier verwendeten Zellsystem p53 durch Huwe1-Depletion akkumuliert. Zum anderen sollte geprüft werden, ob eine p53-Inaktivierung die durch Huwe1-Depletion ausgelöste Repression von Myc-Zielgenen beeinflusst. Huwe1 und p53 wurden mittels lentiviraler Infektion in Ls174T-Zellen depletiert und die Proteinmengen analysiert. Im Western Blot war zu sehen, dass die Expression von Huwe1 und p53 nach jeweiliger Depletion verringert war (Abb. 4.6 A). Dahingegen hatte die Huwe1-Depletion keinerlei Auswirkung auf die p53-Proteinmenge. Abbildung 4.6 B zeigt die zugehörige Expression von *HUWE1* und *TP53* und mehrerer direkter Myc-Zielgene. Auch auf mRNA-Ebene konnte die Depletion von *HUWE1* und *TP53* nachgewiesen werden. Wie schon

im Abschnitt 4.1.3 analysiert wurde, führte die Depletion von Huwe1 zur Repression mehrerer Zielgene von Myc (*HSPE1*, *ODC1*, *CDC25A*). Dieser Effekt wurde durch eine gleichzeitige Depletion von p53 nicht verringert. Außerdem wurde die Phosphorylierung von zwei Proteinen, Atm und Chk2, untersucht, welche die Phosphorylierung und Aktivierung von p53 induzieren (Efeyan & Serrano, 2007). Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit UV-Licht bestrahlt wurden. Der dadurch entstandene DNA-Schaden induziert die Atm-Chk2-p53-Signalkaskade. In UV-behandelten Zellen konnte eine Phosphorylierung von Atm und Chk2 gezeigt werden (Abb. 4.6 C). Im Gegensatz dazu war durch Depletion von Huwe1 keine Phosphorylierung der beiden Proteine nachzuweisen.

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass Huwe1 keinen Einfluss auf die Funktion von p53 hat. Des Weiteren bestätigten die Resultate, dass die beobachteten Effekte nach Huwe1-Depletion im verwendeten Zellsystem nicht p53-vermittelt sind.

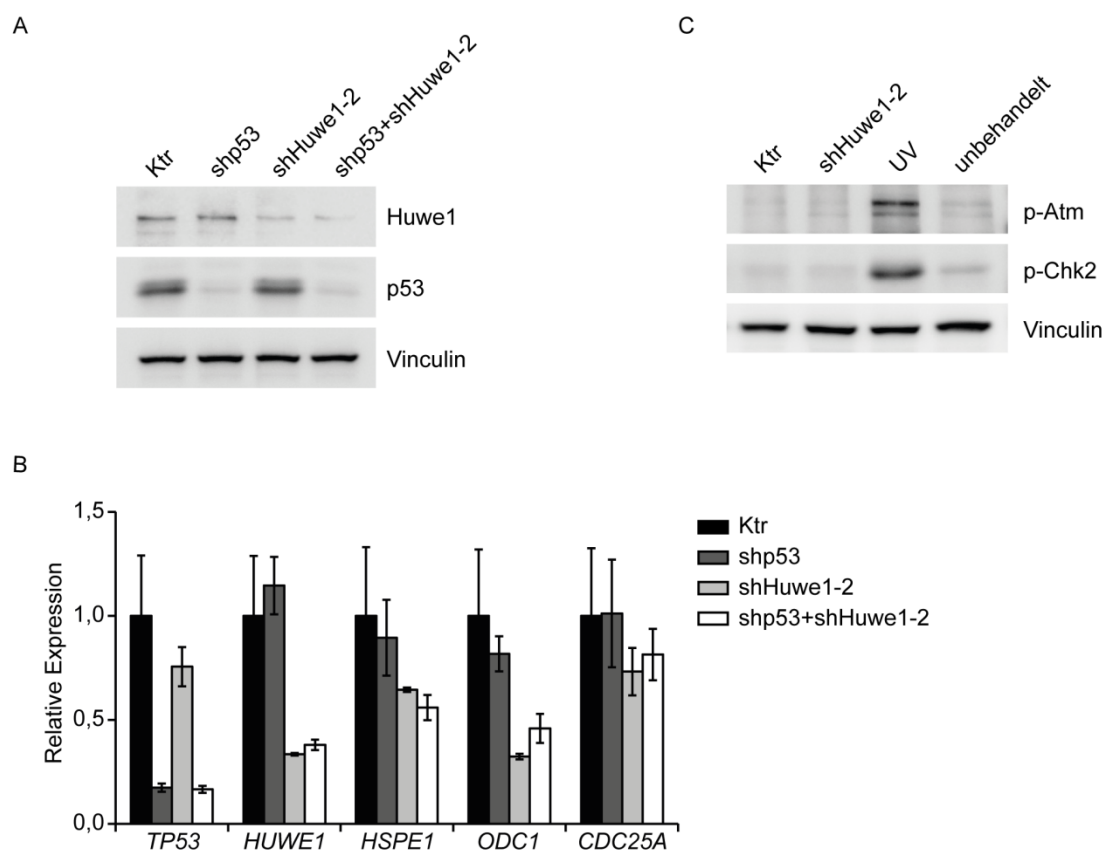


Abb. 4.6 Die Effekte der Huwe1-Depletion sind nicht p53-vermittelt¹

(A) Parallele Depletion von Huwe1 und p53. Huwe1 wurde in Ls174T-Zellen mittels lentiviraler Infektion depletiert, ein Leervektor diente als Kontrolle (Ktr). Zusätzlich wurde eine shRNA gegen p53 verwendet. Die

Proteinlysate wurden im Western Blot auf Proteinmengen von p53 und Huwe1 untersucht. Vinculin diente als Ladekontrolle.

(B) Expression von Myc-Zielgenen nach Depletion von Huwe1 und p53. Der Versuch wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt und anschließend die mRNA-Mengen der angegebenen Gene mittels qRT-PCR quantifiziert. Zur Normalisierung wurde das Gen *B2M* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=2).

(C) Western Blot von Proteinen der p53-Signalkaskade nach Depletion von Huwe1. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt. Die Expression der phosphorylierten Formen von Atm und Chk2 (p-Atm, p-Chk2) wurde im Western Blot nachgewiesen. Zur Kontrolle für die Aktivierung des p53-Signalwegs wurden die Zellen eine Minute mit UV (500 J/m²) bestrahlt und die Zellen drei Stunden später geerntet („UV“). Als Ladekontrolle wurde Vinculin eingesetzt.

4.2 Untersuchung und Validierung von niedermolekularen Huwe1-Inhibitoren

In der bisherigen Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Proliferation von Kolonkarzinomzelllinien als auch die Transaktivierung von Myc-Zielgenen von Huwe1 abhängig sind. Damit wurde Huwe1 als mögliches Zielprotein einer Tumorthherapie validiert. Da Huwe1 als HECT-E3-Ubiquitin-Ligase enzymatische Aktivität besitzt, besteht die Möglichkeit einer spezifischen, direkten Inhibition. In Kooperation mit Boehringer Ingelheim wurden potentielle Huwe1-Inhibitoren über einen *in vitro* Auto-Ubiquitinierungs-Assay identifiziert, welche die Aktivität von Huwe1, aber keiner der anderen getesteten HECT-E3-Ubiquitin-Ligasen inhibierten (Michael Gmachl, persönliche Mitteilung, s. Abschnitt 5.3). In weiterführenden Analysen wurden Substanzen ausgeschlossen, die eine starke Toxizität in Zellkulturexperimenten aufwiesen oder nur sehr schwache inhibitorische Effekte auf die Zellproliferation zeigten (Frauke Debus, Diplomarbeit). Nach Einbezug dieser Kriterien sollten im Folgenden zwei der Substanzen, BI8622 und BI8626, als Huwe1-Inhibitoren validiert und deren Wirkung auf zellulärer Ebene charakterisiert werden.

4.2.1 Die Depletion von Huwe1 hemmt die UV-induzierte Degradierung von Mcl1

Um die Spezifität der beiden Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 in Zellkulturexperimenten zu testen, sollten die Effekte der Substanzen auf bereits beschriebene Substratproteine untersucht werden. Das anti-apoptotische Protein Mcl1 wird, ausgelöst durch einen DNA-Schaden, durch Huwe1 ubiquitiniert und darauf proteasomal degradiert (Zhong et al, 2005). Als erstes sollte verifiziert werden, ob die Depletion von Huwe1 die UV-induzierte Degradierung von Mcl1 verzögern kann. Dafür wurden U2OS-Zellen mit einer shRNA gegen

Huwe1 transduziert, anschließend mit UV-Licht behandelt und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Abbildung 4.7 (links) zeigt eine effiziente Depletion von Huwe1 in den Zellen. In Kontrollzellen konnte ein schneller Abbau von Mcl1 nach UV-Behandlung nachgewiesen werden: Zwei Stunden nach UV-Behandlung war ein Zehntel der Mcl1-Proteinmenge im Vergleich zum Zeitpunkt null vorhanden. In Huwe1-depletierten Zellen war dagegen die Proteinmenge von Mcl1 zu diesem Zeitpunkt nicht einmal um die Hälfte verringert (Abb. 4.7, rechts). Damit wurde bestätigt, dass der UV-induzierte Abbau von Mcl1 von Huwe1 abhängig ist und die Huwe1-Inhibitoren dahingehend auf ihre Aktivität untersucht werden konnten.

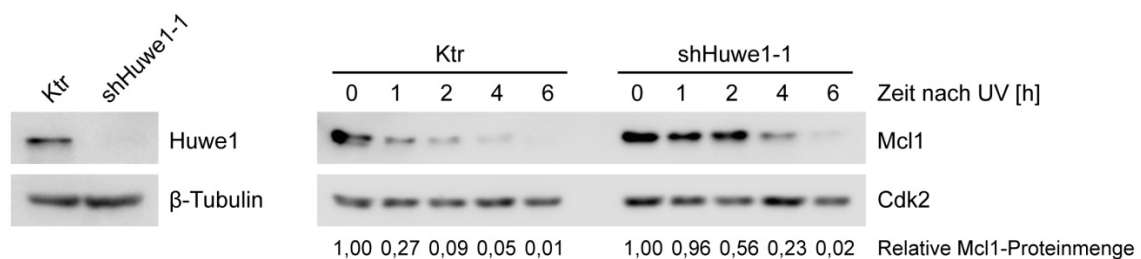


Abb. 4.7 Die UV-induzierte Degradierung von Mcl1 wird durch Huwe1 reguliert¹

Proteinmengen von Mcl1 in Huwe1-depletierten U2OS-Zellen nach UV-Behandlung. Die Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die entweder eine shRNA gegen Huwe1 kodieren oder als Kontrolle eine unspezifische Sequenz enthalten (Ktr). Nach Selektion wurden die Zellen eine Minute mit 500 J/m² UV-Licht behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Proteinlysate wurden mittels Western Blot auf die Expression von Huwe1 und Mcl1 untersucht. β -Tubulin und Cdk2 dienten als Ladekontrollen. Im linken Teil der Abbildung ist die Depletion von Huwe1 dokumentiert. Der rechte Teil zeigt die Mcl1-Proteinmengen in Kontroll- und Huwe1-depletierten Zellen nach UV-Behandlung. Unterhalb des Western Blots sind die Mcl1-Proteinmengen bezogen auf Cdk2 dargestellt.

4.2.2 Die Ubiquitinierung und UV-induzierte Degradierung von Mcl1 wird durch die Huwe1-Inhibitoren gehemmt

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die identifizierten Huwe1-Inhibitoren in der Lage sind, sowohl die Huwe1-vermittelte Ubiquitinierung als auch die UV-induzierte Degradierung von Mcl1 zu hemmen. Dafür wurden *in vivo* Ubiquitinierungsexperimente durchgeführt, bei denen HeLa-Zellen mit Mcl1, His-Ubiquitin und HA-Huwe1 transfiziert wurden. Ubiquitiniertes Mcl1-Protein (Ub-Mcl1) konnte dann mittels Ni-NTA-Agarose präzipitiert und im Western Blot analysiert werden. Die Zellen wurden dabei für 24 h entweder mit

DMSO als Kontrolle oder mit dem jeweiligen Huwe1-Inhibitor (BI8622 oder BI8626) behandelt. Die Koexpression von Mcl1 und His-Ubiquitin führte zu einer schwachen Ubiquitinierung von Mcl1, während die zusätzliche Transfektion von Huwe1 eine Verstärkung der Ubiquitinierung von Mcl1 in DMSO-behandelten Kontrollzellen induzierte (Abb. 4.8 A, Vgl. Spuren 2 und 3). Diese Ubiquitinierung wurde durch Inkubation mit beiden Substanzen beseitigt (Abb. 4.8 A, Spuren 5 und 7). Zur genaueren Analyse wurde BI8622 in mehreren Ubiquitinierungsexperimenten zu den Zellen titriert, von denen ein Western Blot in Abbildung 4.8 B dargestellt ist. Da die Überexpression des gesamten Huwe1-Proteins nicht konsistent möglich war, wurde für dieses Experiment eine N-terminal verkürzte Variante von Huwe1 (HA-ΔN-Huwe1) eingesetzt, welche die katalytisch aktive HECT-Domäne beinhaltet. Obwohl DMSO (D) auch leichte Effekte auf die Huwe1-induzierte Ubiquitinierung von Mcl1 zeigte, konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Ubiquitinierung durch Zugabe von BI8622 beobachtet werden (Abb. 4.8 B, Vgl. Spuren 4 - 7). Die Quantifizierung dieser Ergebnisse resultierte in einem IC₅₀-Wert von 6,8 μM, der damit im ähnlichen Bereich des IC₅₀-Wertes aus dem *in vitro* Auto-Ubiquitinierungsassay lag (3,1 μM, s. Abschnitt 5.3, Michael Gmachl, persönliche Mitteilung). Zur Analyse des UV-induzierten Abbaus von Mcl1 wurden U2OS-Zellen wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben behandelt und parallel mit DMSO, BI8622 oder BI8626 inkubiert. Ähnlich der Depletion von Huwe1 verlangsamte auch die Inhibition von Huwe1 die Degradierung von Mcl1 (Abb. 4.8 C, oben). Anhand der Quantifizierung der relativen Mcl1-Proteinmenge konnte für alle Bedingungen die Halbwertszeit von Mcl1 berechnet werden. Diese verlängerte sich von 98 bzw. 92 min auf 160 min (BI8622) und 144 min (BI8626), was in beiden Fällen statistisch signifikant war (Abb. 4.8 C, unten). Damit konnte gezeigt werden, dass der Abbau von Mcl1 durch Inhibition von Huwe1 gehemmt werden kann.

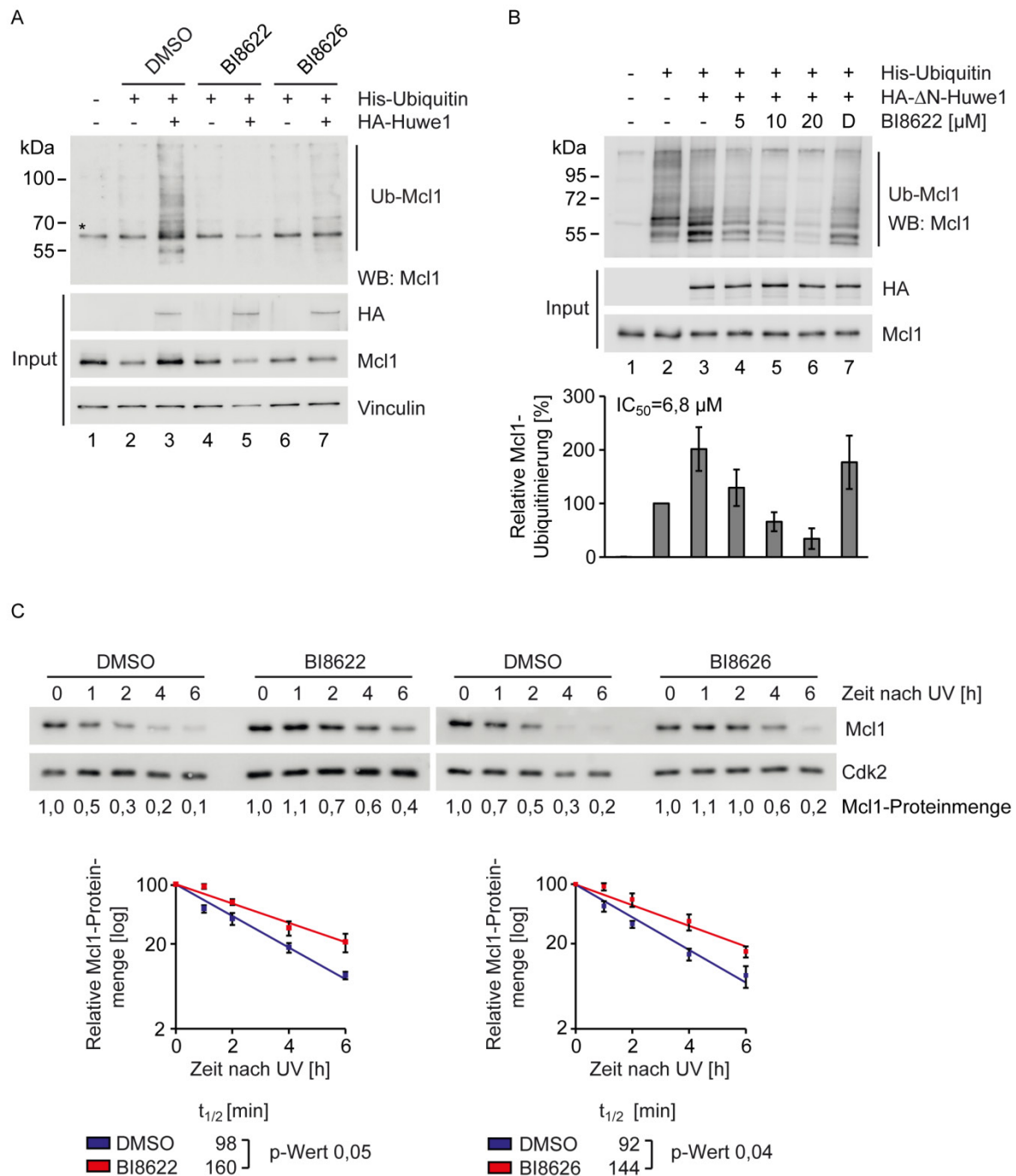


Abb. 4.8 Die Huwe1-Inhibition hemmt die Ubiquitinierung und den UV-induzierten Abbau von Mcl1¹

(A) *In vivo* Ubiquitinierungssassay von Mcl1 nach Inhibition von Huwe1. HeLa-Zellen wurden mit Vektoren transfiziert, die Mcl1, His-Ubiquitin und HA-Huwe1 kodieren. Vor der Ernte wurden die Zellen mit BI8622 und BI8626 (10 μM) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Nach Zellyse wurden Ubiquitin-modifizierte Proteine mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose präzipitiert und der Western Blot der Eluate mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. Eine unspezifische Bande ist gekennzeichnet (*). Als Input-Kontrolle wurde 1 % des Gesamtllysates eingesetzt.

(B) *In vivo* Ubiquitinierungssassay von Mcl1 nach Titration von BI8622. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt. Anstelle des gesamten Huwe1-Proteins wurde hier die N-terminal verkürzte Form HA-ΔN-Huwe1 verwendet. Die Substanz BI8622 wurde in angegebenen Konzentrationen zu den Zellen titriert, DMSO (D) diente als Lösungsmittelkontrolle. Die unten dargestellte Quantifizierung zeigt den Mittelwert der

relativen Ubiquitinierung von Mcl1 (bezogen auf die DMSO-Kontrolle) mit Standardabweichung (n=3). Der IC_{50} -Wert wurde mit dem *four parameter logistic equation model* berechnet.

(C) Western Blot des UV-induzierten Abbaus von Mcl1. U2OS-Zellen wurden mit 10 μ M BI8622 oder BI8626 inkubiert, DMSO diente als Kontrolle. Parallel wurden die Zellen mit 500 J/m² UV-Licht bestrahlt und nach den genannten Zeitpunkten geerntet. Die obere Abbildung zeigt die Immunblots der Lysate, die mit Antikörpern gegen Mcl1 oder Cdk2 inkubiert wurden. Direkt unter den Western Blots ist die Quantifizierung der Mcl1-Proteinmenge (relativ zur Cdk2-Proteinmenge) angegeben. Die Diagramme stellen den Mittelwert der relativen Mcl1-Proteinmenge mit Standardfehler des arithmetischen Mittels dar (n=5). Aus diesen Quantifizierungen wurde die jeweilige Halbwertszeit von Mcl1 bestimmt. p-Werte wurden mit Hilfe eines gepaarten Student's t-Test berechnet.

4.2.3 Die Inhibition von Huwe1 stabilisiert das Protein TopBP1

Neben Mcl1 wurde TopBP1 als ein weiteres Substratprotein von Huwe1 beschrieben (Herold et al, 2008). TopBP1 ist normalerweise an der Steuerung der DNA-Replikation und der Atr-vermittelten DNA-Schadensantwort beteiligt (Delacroix et al, 2007; Kumagai et al, 2006). Herold und Kollegen konnten zeigen, dass Miz1 die Lokalisation einer Fraktion von TopBP1 an Chromatin vermittelt. Chromatingebundenes TopBP1 wird vor Ubiquitinierung und Abbau durch Huwe1 geschützt und induziert somit den Atr-Signalweg. Lösliches TopBP1, welches nicht an Chromatin gebunden ist, wird dahingegen durch Huwe1 ubiquitiniert und infolgedessen degradiert. Als experimenteller Ansatz sollte daher getestet werden, ob die Inhibition von Huwe1 zur Akkumulation von löslichem TopBP1 führt. Dafür wurden Ls174T-Zellen für unterschiedliche Zeiten mit den Huwe1-Inhibitoren behandelt und anschließend eine Fraktionierung durchgeführt. Dabei wurden lösliche zyto- bzw. nukleoplasmatische von chromatingebundenen Proteinen durch mehrere Zentrifugationsschritte getrennt. Die lösliche Fraktion wurde dann im Western Blot auf die Expression von TopBP1 und zwei Kontrollproteinen, β -Tubulin und H2B, untersucht. Es konnte eine effiziente Fraktionierung bestätigt werden, da zytoplasmatisches β -Tubulin in der löslichen Fraktion vorhanden war (Abb. 4.9). Dahingegen war das Histon H2B, welches sich in der Chromatinfraction befinden sollte, nur sehr schwach nachzuweisen. In DMSO-behandelten Zellen (-) war die Expression von TopBP1 ebenfalls sehr schwach, was darauf hindeutet, dass ein Großteil des Proteins in löslicher Form sofort abgebaut wird. Mit Zugabe der Huwe1-Inhibitoren konnte bereits nach kurzer Zeit (vier Stunden für BI8622, zwei Stunden für BI8626) eine Akkumulation von TopBP1 festgestellt werden.

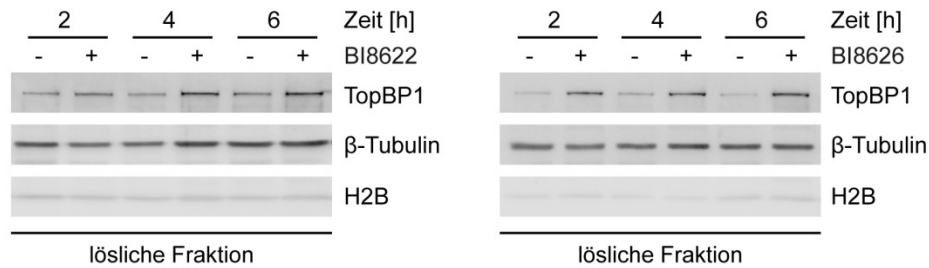


Abb. 4.9 Die Inhibition von Huwe1 induziert die Akkumulation von löslichem TopBP1¹

Fraktionierungsexperiment nach Inhibition von Huwe1. Ls174T-Zellen wurden mit BI8622 oder BI8626 (10 μ M) behandelt. DMSO (-) diente als Kontrollsubstanz. Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Zelllysate in chromatingebundene und lösliche Fraktionen aufgetrennt. Die Western Blots der löslichen Fraktion wurden mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. β -Tubulin und H2B dienten als Ladekontrollen und Nachweis der effizienten Fraktionierung.

4.3 Analyse der Huwe1-Inhibitoren als potentielle Tumortheraeutika

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Identifikation der Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 beschrieben und gezeigt, dass diese den Abbau der beiden Huwe1-Substrate Mcl1 und TopBP1 hemmen. Anhand dieser Resultate konnte validiert werden, dass die Inhibitorsubstanzen Huwe1 effizient in Zellen inhibieren. Wie schon eingangs erläutert, soll die Inhibition von Huwe1 ein mögliches Mittel zur Tumorthherapie im Kolonkarzinom darstellen. Um dies zu untersuchen, sollten im Folgenden die Effekte der Hemmung von Huwe1 auf die Proliferation und im nächsten Schritt auf die Myc-Funktion analysiert werden. Dabei wurde auch verglichen, inwieweit die Inhibition von Huwe1 mit den Ergebnissen der Huwe1-Depletion korreliert.

4.3.1 Die Inhibition von Huwe1 führt zum Proliferationsarrest verschiedener Kolonkarzinomzelllinien

Um die zellulären Effekte der Huwe1-Inhibitoren mit der Depletion von Huwe1 vergleichen zu können, wurden für die nachfolgenden Experimente die gleichen Zelllinien wie unter Abschnitt 4.1.1 verwendet. Die Titration der Inhibitoren BI8622 und BI8626 in Ls174T-Zellen führte zu einem konzentrationsabhängigen Arrest der Proliferation, wie in der Kristallviolett-färbung erkennbar ist (Abb. 4.10 A). Die Quantifizierung der Färbung ergab IC₅₀-Werte von 8,7 μ M (BI8622) und 3,7 μ M (BI8626). Diese Zahlen waren somit

vergleichbar mit den *in vitro* ermittelten Werten. Drei weitere Zelllinien des Kolonkarzinoms, HCT116, HT-29 und SW480, reagierten auf eine Depletion von Huwe1 mit einer verlangsamten Proliferation (s. Abschnitt 4.1.1). Die Zellen wurden für diesen Versuch jeweils mit 10 und 20 μM der Huwe1-Inhibitoren behandelt. Sowohl HCT116, HT-29 als auch SW480 reagierten mit einem Proliferationsarrest, wobei sich die Sensitivität geringfügig unterschied (Abb. 4.10 B).

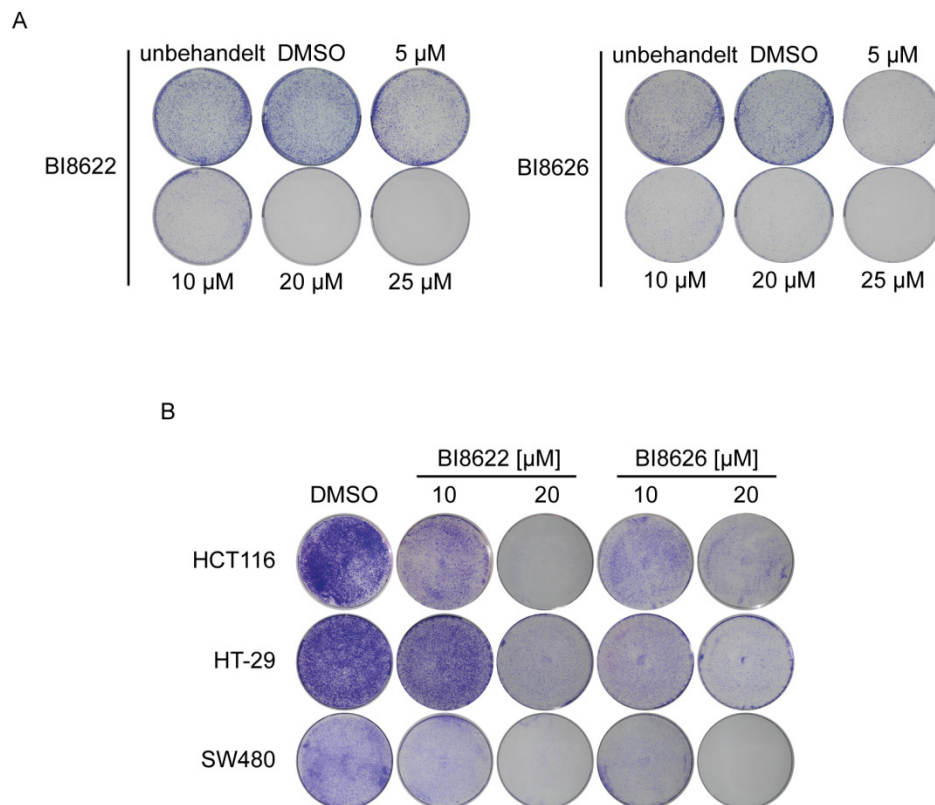


Abb. 4.10 Die Hemmung von Huwe1 induziert einen Proliferationsarrest in Kolonkarzinomzelllinien¹

(A) Kristallviolettgefärbung von Ls174T-Zellen nach Huwe1-Inhibition. Die Zellen wurden dünn ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen BI8622 oder BI8626 behandelt. Unbehandelte oder DMSO-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit Kristallviolett-Lösung gefärbt.

(B) Kristallviolettgefärbung verschiedener Kolonkarzinomzelllinien nach Inhibition von Huwe1. Es wurden HCT116, HT-29 und SW480 Zellen analysiert. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben ausgeführt. Die Inhibitorsubstanzen wurden in einer Konzentration von 10 und 20 μM verwendet.

Um den Einfluss der Huwe1-Inhibitoren auf die Zellzyklusverteilung genauer zu untersuchen, wurde mit den Ls174T-Zellen eine durchflusszytometrische Analyse (FACS) nach Inhibitorbehandlung durchgeführt. Die Prozentzahl an Zellen in der S-Phase verringerte sich

konzentrationsabhängig von 27 % (DMSO) auf 13 % (BI8622) bzw. 10 % (BI8626) (Abb. 4.11 A, dunkelgraue Balken). Auch der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase verminderte sich von 17 % nach DMSO-Behandlung auf 10 % (BI8622) und 9 % (BI8626) nach Behandlung mit jeweils 20 μ M der Inhibitoren (Abb. 4.11 A, hellgraue Balken). Dagegen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus: Während sich in DMSO-behandelten Proben 50 % der Zellen in der G1-Phase befanden, stieg der Anteil der Zellen nach Inhibitorbehandlung auf 71 % (BI8622) und 74 % (BI8626) an (Abb. 4.11 A, schwarze Balken). Die Prozentzahl apoptotischer Zellen (SubG1) erhöhte sich schwach von 3 % nach DMSO-Behandlung auf 4 % (BI8622) bzw. 6 % (BI8626) mit 20 μ M der Huwe1-Inhibitoren (Abb. 4.11 A, weiße Balken). Zusätzlich wurden die Zellen vor der Ernte mit Bromdesoxyuridin (BrdU) behandelt, das in neu synthetisierte DNA inkorporiert wird. Dies kann als Maß für die Proliferationsrate und den Anteil an Zellen in der S-Phase dienen. Mit Inhibition von Huwe1 konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zahl BrdU-positiver Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.11 B). Außerdem wurde eine Wachstumskurve über vier Tage aufgenommen. Für unbehandelte und DMSO-behandelte Zellen konnte ein erwartetes exponentielles Wachstum festgestellt werden, welches hingegen in Inhibitor-behandelten Zellen gehemmt war (Abb. 4.11 C, links, durchgehende Linien). Weiterhin war zu beobachten, dass die Zellen wieder mit der Proliferation begannen, wenn nach zwei Tagen die Inhibitorsubstanzen entfernt wurden (Abb. 4.11 C, links, gestrichelte Linien). Anhand der Wachstumskurve konnte die Verdopplungszeit der Zellen und daraus wiederum mit Hilfe der jeweiligen Prozentzahl an Zellen aus der FACS-Analyse die Dauer jeder einzelnen Phase des Zellzyklus berechnet werden. Wie aus Abbildung 4.11 C (rechts) ersichtlich ist, war die G1-Phase durch Inhibition von Huwe1 von etwa 10 Minuten (DMSO) auf 70 Minuten (BI8622) bzw. 80 Minuten (BI8626) verlängert. Die Dauer der S- und G2/M-Phase zeigte nach Inhibitorbehandlung dagegen nur einen zwei- bzw. dreifachen Anstieg. Da die Zellen wie beschrieben nach Entfernung der Huwe1-Inhibitoren wieder in den Zellzyklus eintraten (s. Abb. 4.11 C), konnte von einem reversiblen Effekt ausgegangen werden. Um dies zu verifizieren, wurde eine Seneszenzfärbung durchgeführt, bei der die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) bestimmt wird (s. Abschnitt 3.2.14). Als Positivkontrolle wurden Ls174T-Zellen über drei Tage mit Etoposid behandelt, das einen DNA-Schaden und anschließende Seneszenz induziert (te Poele et al, 2002). Die Inkubation der Zellen mit Etoposid resultierte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in einer Blaufärbung

der Zellen, was auf eine hohe SA- β -Gal-Aktivität hindeutete (Abb. 4.11 D). Weder BI8622 noch BI8626 lösten eine ähnlich starke Färbung der Zellen aus.

Zusammenfassend konnte validiert werden, dass die Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 die Proliferation von Kolonkarzinomzellen hemmen. Der Proliferationsarrest war reversibel und die Zellen zeigten kein Zeichen von Seneszenz, da keine SA- β -Gal-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse entsprachen zudem den Beobachtungen einer gehemmten Proliferation nach Depletion von Huwe1 (s. Abschnitt 4.1.1), womit die Aktivität der Substanzen gegen Huwe1 erneut validiert wurde.

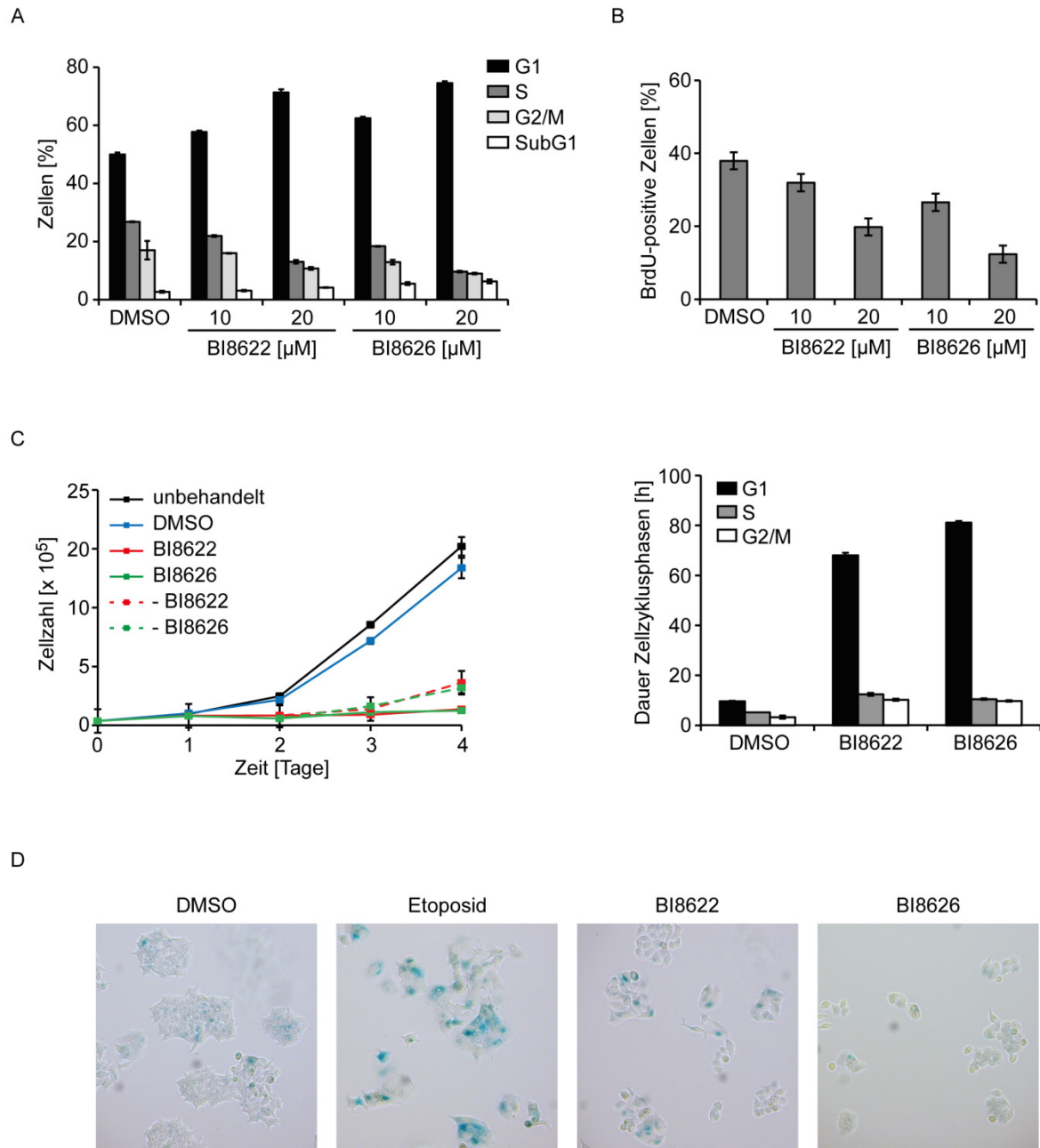


Abb. 4.11 Der Proliferationsarrest nach Huw1-Inhibition ist ein reversibler G1-Phase-Arrest¹

(A) Zellzyklusanalyse von Ls174T-Zellen nach Huw1-Inhibition. Die Zellen wurden mit BI8622 und BI8626 in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit BrdU markiert und eine Stunde später für eine FACS-Analyse mit Propidiumiodidfärbung geerntet. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=2).

(B) Anzahl BrdU-positiver Zellen nach Huw1-Inhibition. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist der Anteil der BrdU-positiven Ls174T-Zellen mit Mittelwerten und Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines Experiments (n=2).

(C) Wachstumskurve von Inhibitor-behandelten Ls174T-Zellen. Die Zellen wurden über vier Tage in Anwesenheit von BI8622 oder BI8626 (20 μ M) kultiviert und jeden Tag gezählt (links). Unbehandelte und DMSO-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Alternativ wurde nach zwei Tagen das Medium entfernt und neues Medium ohne Inhibitoren zugegeben (-BI8622 und -BI8626). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von biologischen Replikaten (n=3). Im rechten Diagramm wurde mit Hilfe der FACS-Analyse und der Wachstumskurve mit vier Tagen Inhibitorbehandlung die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen

berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=2).

(D) Seneszenzfärbung von Huwe1-Inhibitor-behandelten Ls174T-Zellen. Die Zellen wurden über drei Tage mit DMSO, Etoposid (2 μ M), BI8622 oder BI8626 (je 20 μ M) kultiviert. Nach Fixierung erfolgte eine SA- β -Galaktosidase-Färbung über Nacht mit anschließender Auswertung am Mikroskop.

4.3.2 Die Huwe1-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Proliferation muriner embryonaler Stammzellen

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt werden konnte, sind Kolonkarzinomzellen in ihrer Proliferation von Huwe1 abhängig. Im Gegensatz dazu zeigen murine embryonale Stammzellen und auch neuronale Vorläuferzellen diese Abhängigkeit nicht. Vielmehr wird Huwe1 zur Regulation der Differenzierung durch Ubiquitinierung und Destabilisierung von N-Myc benötigt (Zhao et al, 2009; Zhao et al, 2008). Zur Hemmung der Differenzierung werden Stammzellen in Anwesenheit von LIF (*leukaemia inhibitory factor*) kultiviert. Es wurde beschrieben, dass der Entzug von LIF einen Huwe1-vermittelten Abbau von N-Myc induziert und dies durch Depletion von Huwe1 verzögert wird (Zhao et al, 2008). Um zu überprüfen, ob die Inhibition von Huwe1 die Proliferation muriner embryonaler Stammzellen beeinflusst, wurden diese zusammen mit LIF über mehrere Tage mit den Substanzen BI8622 und BI8626 behandelt und eine Wachstumskurve aufgezeichnet. Weder BI8622 noch BI8626 schränkten die Proliferation der Zellen im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollzellen ein (Abb. 4.12 A). Auch eine FACS-Analyse von Propidiumiodid-gefärbten Zellen zeigte nach Inhibition von Huwe1 weder eine Änderung in der Zellzyklusverteilung noch einen Anstieg der Zahl apoptotischer Zellen (Abb. 4.12 B). Um zu verifizieren, dass während der Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen die N-Myc-Proteinmenge abnimmt, wurden die Zellen ohne LIF mit paralleler Behandlung von Retinolsäure (RS) kultiviert. Retinolsäure gilt als Induktionsmittel der Differenzierung embryonaler Stammzellen (Rohwedel et al, 1999). In unbehandelten und damit undifferenzierten Zellen konnte im Western Blot sowohl die Expression von N-Myc als auch Oct-4, einem Marker für undifferenzierte Stammzellen (Pesce & Scholer, 2001), nachgewiesen werden (Abb. 4.12 C). Der Entzug von LIF und die Behandlung mit RS reduzierten die Mengen beider Proteine, sodass diese nicht mehr nachzuweisen waren. Somit kann von einer Differenzierung der Zellen ausgegangen werden. Nach dem Entzug von LIF über mehrere Tage ohne RS-Behandlung wurde wie erwartet eine Verringerung der Proteinmenge von N-Myc beobachtet

(Abb. 4.12 D, DMSO). Nach zwei Tagen ohne LIF war die N-Myc-Proteinmenge bereits auf 60 % reduziert und nach vier Tagen ohne LIF konnten nur noch 20 % der Proteinmenge nachgewiesen werden. Dies korrelierte mit einer Abnahme der Proteinmenge von Oct-4 während der Kultivierung der Zellen ohne LIF. Durch Inhibition von Huwe1 mit sowohl BI8622 als auch BI8626 wurde die Abnahme von N-Myc verzögert, sodass vier Tage nach LIF-Entzug 40 % (BI8622) bzw. 70 % (BI8626) des Proteins vorhanden waren (Abb. 4.12 D, BI8622 und BI8626). Auch die Menge an Oct-4-Protein änderte sich nach LIF-Entzug mit Inhibitorbehandlung im Vergleich zu DMSO-Kontrollzellen nicht.

Die Ergebnisse bestätigten, dass Huwe1 nicht für die Proliferation von murinen embryonalen Stammzellen notwendig ist. Damit wurde die Beobachtung unterstützt, dass Huwe1 in verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche Funktionen erfüllt und überdies konnte dadurch die tumorzellspezifische Wirkung der Huwe1-Inhibitoren nachgewiesen werden.

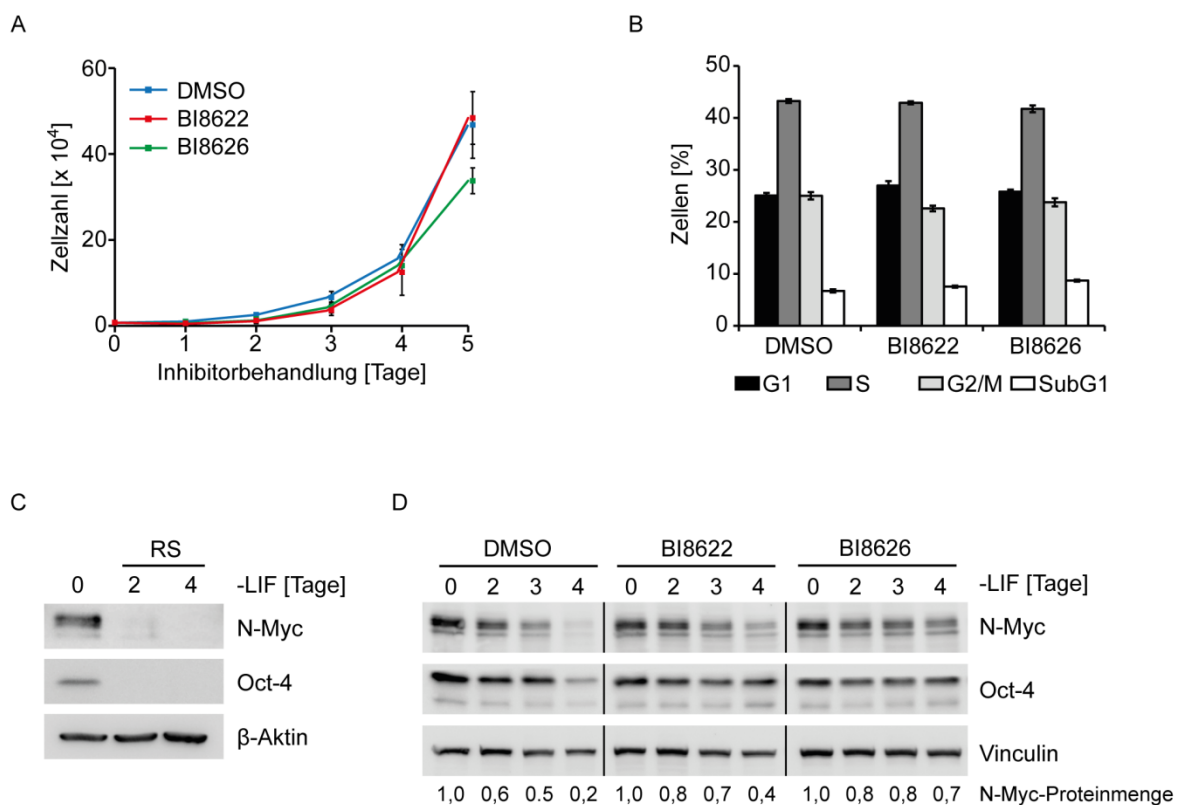


Abb. 4.12 Die Proliferation muriner embryonaler Stammzellen ist nicht abhängig von Huwe1¹

(A) Wachstumskurve von murinen embryonalen Stammzellen nach Huwe1-Inhibition. E14-Stammzellen wurden in Anwesenheit von LIF und den Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 (10 μ M) über mehrere Tage kultiviert, DMSO diente als Kontrolle. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und die Inhibitoren daraufhin erneut zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen biologischer Replikate (n=3).

(B) Zellzyklusverteilung von murinen embryonalen Stammzellen nach Inhibition von Huwe1. E14-Stammzellen wurden mit BI8622 und BI8626 (10 μ M) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und mittels FACS analysiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=2).

(C) Expression von N-Myc und Oct-4 nach Behandlung mit Retinolsäure. E14-Stammzellen wurden für den angegebenen Zeitraum ohne LIF kultiviert. Während des Entzugs von LIF wurden die Zellen mit 1 μ M Retinolsäure (RS) behandelt. Die Lysate wurden im Western Blot auf die Expression von N-Myc und Oct-4 untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

(D) N-Myc-Proteinmenge nach Entzug von LIF und Inhibition von Huwe1. E14-Zellen wurden über den angegebenen Zeitraum ohne LIF kultiviert. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe der Substanzen BI8622 und BI8626 (10 μ M) oder von DMSO. Die Proteinlysate wurden im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Vinculin diente als Ladekontrolle. Unterhalb des Western Blots ist die Quantifizierung der relativen N-Myc-Proteinmenge (bezogen auf Vinculin) dargestellt.

4.3.3 Die Expression von Myc wird nicht durch die Inhibition von Huwe1 reguliert

In Abschnitt 4.1.3 konnte bereits gezeigt werden, dass die Depletion von Huwe1 keinen Einfluss auf die Protein- und mRNA-Menge von Myc hat. Dies sollte ebenfalls für die Huwe1-Inhibition untersucht werden. Zur Analyse wurden Ls174T-Zellen mit BI8622 und BI8626 behandelt. Es wurden Konzentrationen von 10 und 20 μ M gewählt, da in diesem Bereich bisher die stärksten Effekte auf Proliferation und Genexpression zu beobachten waren. Beide Huwe1-Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf die Proteinmenge von Myc, auch nicht bei der höheren Konzentration von 20 μ M (Abb. 4.13 A). Des Weiteren war auch die Expression von Myc auf mRNA-Ebene unverändert durch Huwe1-Inhibition (Abb. 4.13 B). In anderen Zelllinien (HCT116, HT-29, SW480) des Kolonkarzinoms konnte in vorherigen Experimenten die Wirksamkeit der Inhibitoren ebenfalls validiert werden (s. Abschnitt 4.3.1). Daher sollte geprüft werden, wie sich die Proteinmenge von Myc unter Huwe1-Inhibition in diesen Zellen verhält, wofür die Substanz BI8622 verwendet wurde. Anstelle von SW480-Zellen wurden SW620-Zellen eingesetzt, die vom selben Tumorpatienten stammen wie SW480, aber ein späteres Stadium des Kolonkarzinoms repräsentieren. In allen drei getesteten Zelllinien blieb die Expression von Myc auf Proteinebene mit steigenden Konzentrationen von BI8622 stabil (Abb. 4.13 C). Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass auch die Inhibition von Huwe1 keinen Einfluss auf die Expression von Myc hat.

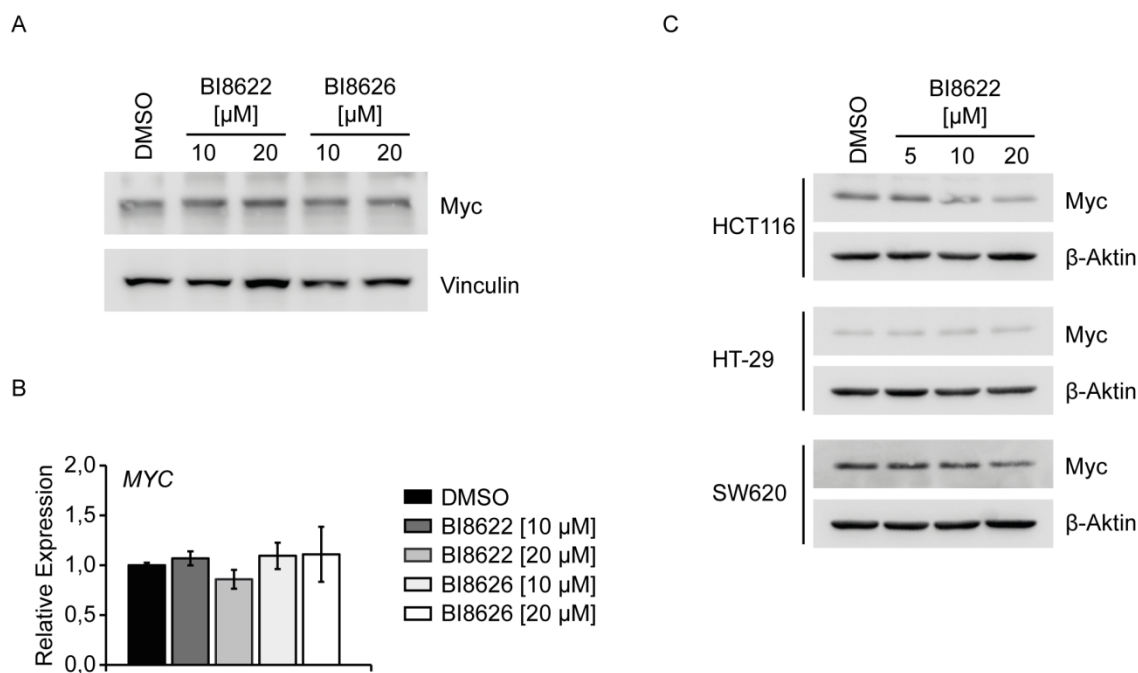


Abb. 4.13 Die Huwe1-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Expression von Myc

(A) Proteinexpression von Myc nach Inhibition von Huwe1. Ls174T-Zellen wurden in der Gegenwart von BI8622 und BI8626 in angegebenen Konzentrationen 16 h kultiviert. DMSO diente als Kontrolle. Der Western Blot der Proteinlysate wurde mit einem Antikörper gegen Myc analysiert. Vinculin wurde als Ladekontrolle eingesetzt.

(B) mRNA-Expression von Myc nach Huwe1-Inhibition. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt und die RNA isoliert. Die mRNA-Menge von Myc wurde mittels qRT-PCR bestimmt und die relative Expression bezogen auf das Gen *B2M* berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=3).

(C) Proteinmenge von Myc in HCT116, HT-29 und SW620 unter Huwe1-Inhibition. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt. Es wurde die Inhibitorsubstanz BI8622 verwendet.

4.3.4 Die Inhibition von Huwe1 reprimiert Myc-aktivierte Zielgene

In Abschnitt 4.3.1 konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Huwe1 einen Zellzyklusarrest in Ls174T-Zellen induziert, was mit den Ergebnissen der Huwe1-Depletion korreliert. Daher stellte sich die Frage, ob analog zur Depletion auch die Inhibition von Huwe1 die Transaktivierungsfunktion von Myc einschränkt. Um dies zu untersuchen, wurden Ls174T-Zellen mit den Substanzen BI8622 und BI8626 in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die Expression mehrerer Myc-Zielgene analysiert. In Abbildung 4.14 A sind die Ergebnisse der qRT-PCR dargestellt. Beide Inhibitorsubstanzen reprimierten die Expression Myc-induzierter Zielgene (*HSPE1*, *ODC1*, *NCL*, *CDC25A*, *CCNA2*) im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen. Bei einigen der Gene (*HSPE1*, *NCL*, *CDC25A*) erfolgte

dies abhängig von der Konzentration: Mit 20 μ M wurde ein stärkerer Effekt erreicht als mit 10 μ M. Auch das Myc-reprimierte Gen *CDKN1A* zeigte eine Verringerung der mRNA-Menge nach Inhibition von Huwe1. Dagegen blieb die Expression des Kontrollgens *RPS14*, das durch Myc nicht beeinflusst werden sollte, unverändert. Nach zwei bis vier Tagen Inhibitorbehandlung wurde zudem eine Induktion des Differenzierungsmarkers *MUC2* beobachtet (Abb. 4.14 B), was mit dem Resultat der Huwe1-Depletion korrelierte (s. Abschnitt 4.1.3). Zur Verifizierung, dass die Hemmung der Myc-induzierten Transaktivierung über Huwe1 erfolgt, wurde das Experiment anschließend mit 20 μ M BI8622 und BI8626 in Huwe1-depletierten Zellen durchgeführt. Die Inhibitor-behandelten Kontrollzellen (Ktr) zeigten die bereits beobachtete Verringerung der mRNA-Menge der Myc-induzierten Gene *HSPE1*, *ODC1* und *CCNA2* (Abb. 4.14 C). Die Repression der Genexpression durch die Inhibitoren BI8622 und BI8626 war in Huwe1-depletierten Zellen dagegen vollständig aufgehoben. Zwar zeigte die Depletion von Huwe1 an sich die erwartete Repression der Myc-aktivierten Zielgene, dies wurde durch zusätzliche Inhibition von Huwe1 aber nicht weiter verstärkt.

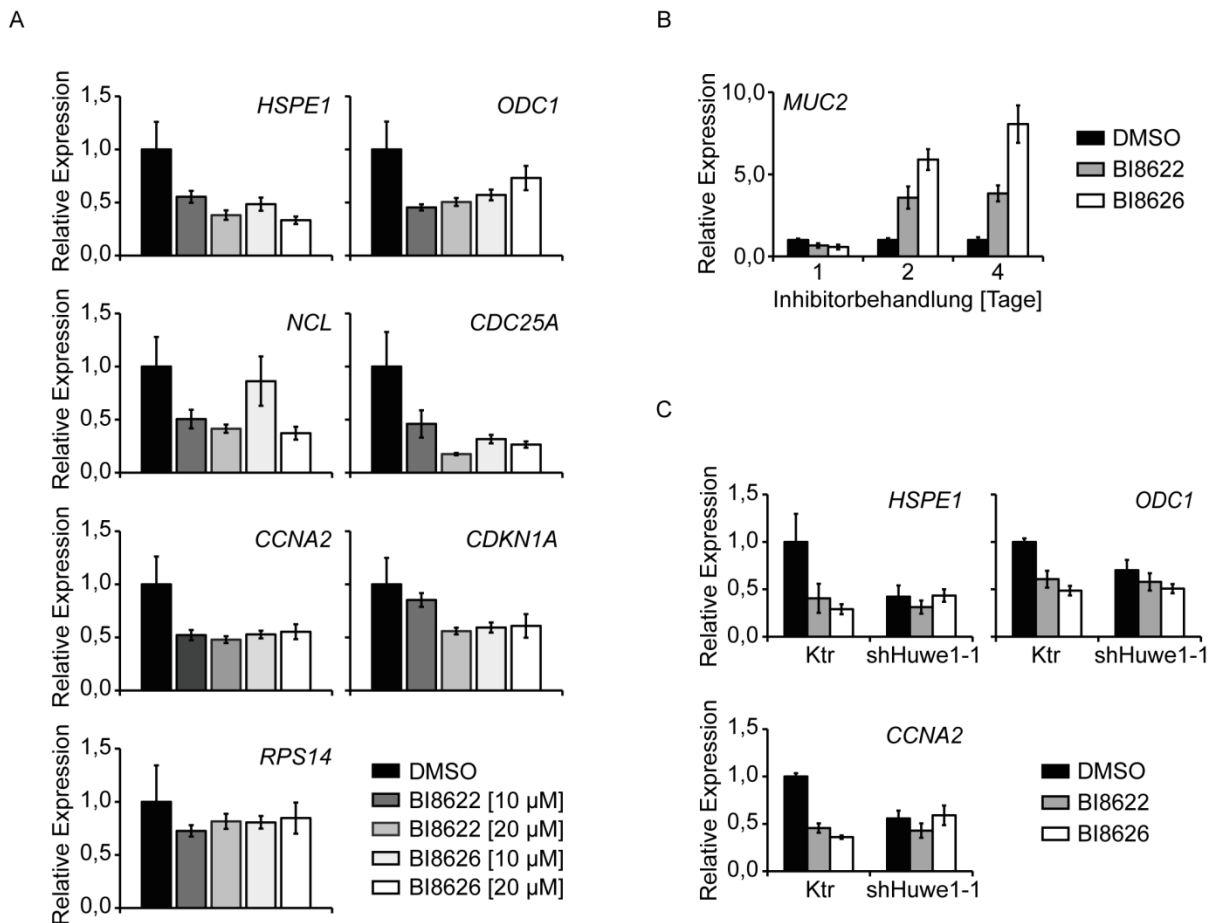


Abb. 4.14 Die Inhibition von Huwe1 führt zur Repression Myc-induzierter Zielgene¹

(A) Expression von Myc-Zielgenen nach Titration der Huwe1-Inhibitoren. Ls174T-Zellen wurden 16 h mit den angegebenen Konzentrationen BI8622 und BI8626 behandelt, DMSO wurde als Kontrolle verwendet. Aus der isolierten RNA wurde mittels qRT-PCR die mRNA-Menge der gezeigten Gene bestimmt. Es wurden Myc-aktivierte Gene (*HSPE1*, *ODC1*, *NCL*, *CDC25A*, *CCNA2*), ein reprimiertes Gen (*CDKN1A*) und ein Kontrollgen (*RPS14*) untersucht. Die Expression wurde auf das Gen *B2M* normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=5).

(B) Expression des Differenzierungsmarkers *MUC2* nach Inhibition von Huwe1. Ls174T-Zellen wurden über den angegebenen Zeitraum mit BI8622 und BI8626 (je 20 μM) behandelt, DMSO diente als Kontrolle. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde die Expression von *MUC2*, bezogen auf *B2M*, in einer qRT-PCR bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von technischen Triplikaten (n=3).

(C) Effekte der Huwe1-Inhibitoren in Huwe1-depletierten Zellen. Huwe1 wurde mit Hilfe einer lentiviralen shRNA in Ls174T-Zellen depletiert. Anschließend erfolgte die Inhibitorbehandlung mit je 20 μM BI8622 und BI8626 oder mit DMSO als Kontrolle. Die mRNA-Mengen von *HSPE1*, *ODC1* und *CCNA2* wurden mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen von technischen Triplikaten (n=3).

4.3.5 Die Huwe1-Inhibitoren beeinflussen die Myc-induzierte Transaktivierung global

Die Analyse der Genexpression einiger Myc-aktivierter Gene nach Huwe1-Inhibition gab erste Hinweise darauf, dass die Transaktivierungsfunktion von Myc eingeschränkt ist. Um

dies genomweit zu bestätigen, wurde aus Inhibitor-behandelten (20 μ M) Ls174T-Zellen RNA isoliert und für einen Microarray eingesetzt. Die bioinformatische Analyse der Daten wurde von Lukas Rycak (Universität Marburg) vorgenommen. Bei einer mehr als zweifachen Expressionsänderung, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, führten beide Inhibitorsubstanzen zu einer Hoch- und Herunterregulation einer Vielzahl an Genen (Abb. 4.15 A). Für die Gene, die signifikant hoch- bzw. herunterreguliert waren, wurde jeweils eine Anreicherungsanalyse ausgehend von einer hypergeometrischen Verteilung mit den C2-Gensets der MSigDB ausgeführt. Dabei war zu erkennen, dass durch beide Huwe1-Inhibitoren reprimierte Gene in einer großen Anzahl an Gensets angereichert waren (Abb. 4.15 B, oben). Dagegen waren durch die Substanzen hochregulierte Gene in nur sehr wenigen Gensets angereichert, die sich zudem voneinander unterschieden. Unter den angereicherten Gensets, welche die durch Huwe1-Hemmung reprimierten Gene enthielten, fanden sich in der Literatur beschriebene Myc-aktivierte Gensets und zudem Gensets, die mit einer Myc-Funktion assoziiert sind (Abb. 4.15 B, unten) (Fujii et al, 2008; Kobayashi et al, 2006; Menssen & Hermeking, 2002; Wong et al, 2008; Yu et al, 2005; Zeller et al, 2003). So ist bekannt, dass Myc durch mitogene Stimulation z. B. über den Egfr-Signalweg induziert wird oder dass Myc wiederum die Expression des Transkriptionsfaktors Ybx1 direkt aktivieren kann (Sears et al, 2000; Uramoto et al, 2002). Wong und Kollegen konnten zudem zeigen, dass Myc in der Lage ist, ein Genexpressionsprogramm in embryonalen Stammzellen zu aktivieren (Wong et al, 2008). Im nächsten Schritt wurden die signifikant regulierten Gene nach Inhibitor-Behandlung nach direkten Myc-Zielgenen gefiltert. Dafür wurden Datensätze eines ChIP-Seq-Experiments (Chromatin-Immunpräzipitation mit Hochdurchsatzsequenzierung) für Myc aus HeLa-Zellen verwendet (Walz et al, 2014). Als direkte Zielgene von Myc wurden Gene definiert, die annotierte Myc-Bindestellen ± 2 kb um die Transkriptionsstartstelle (TSS) enthielten. Die Anreicherungsanalyse mit den gefilterten Genlisten zeigte vergleichbare Ergebnisse wie mit allen regulierten Genen (Abb. 4.15 C). Es war eine Anreicherung vieler Gensets in durch Huwe1-Inhibition reprimierten Myc-Zielgenen nachzuweisen und beide Inhibitoren regulierten in signifikanter Weise identische Gensets. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter den hochregulierten Genen eine Anreicherung nur sehr weniger Gensets und zudem war der Überlapp zwischen BI8622 und BI8626 nicht statistisch signifikant. Die Resultate deuten darauf hin, dass die Repression von Genen bzw. Myc-Zielgenen eine *on-target* Aktivität beider Inhibitorsubstanzen widerspiegelt, während die hochregulierten Gene eher *off-target* Effekte darstellen könnten. Die globale Repression von Myc-induzierten Zielgenen durch

Huwei1-Inhibition, wie schon in der Anreicherungsanalyse gezeigt, sollte durch eine GSEA mit den ungefilterten Expressionsdaten bestätigt werden. In Abbildung 4.15 D (oben) sind zwei Beispiele von Gensets aus der MSigDB gezeigt, die publizierte Myc-aktivierte Gene enthalten (Schuhmacher et al, 2001; Zeller et al, 2003). In diesen war eine signifikante Anreicherung von durch Huwei1-Inhibition reprimierten Genen nachzuweisen. Währenddessen waren keine Gene in Myc-reprimierten Gensets signifikant angereichert (Abb. 4.15 D, unten) (Schuhmacher et al, 2001; Yu et al, 2005; Zeller et al, 2003).

In Abschnitt 4.3.4 wurde bereits die Repression der Transaktivierungsfunktion von Myc für mehrere Zielgene nachgewiesen (s. Abb. 4.14 A). Aus den genomweit erhobenen Expressionsdaten konnte zusammenfassend geschlossen werden, dass die Inhibition von Huwei1 die Aktivierung von Myc-Zielgenen in Kolonkarzinomzellen global blockiert.

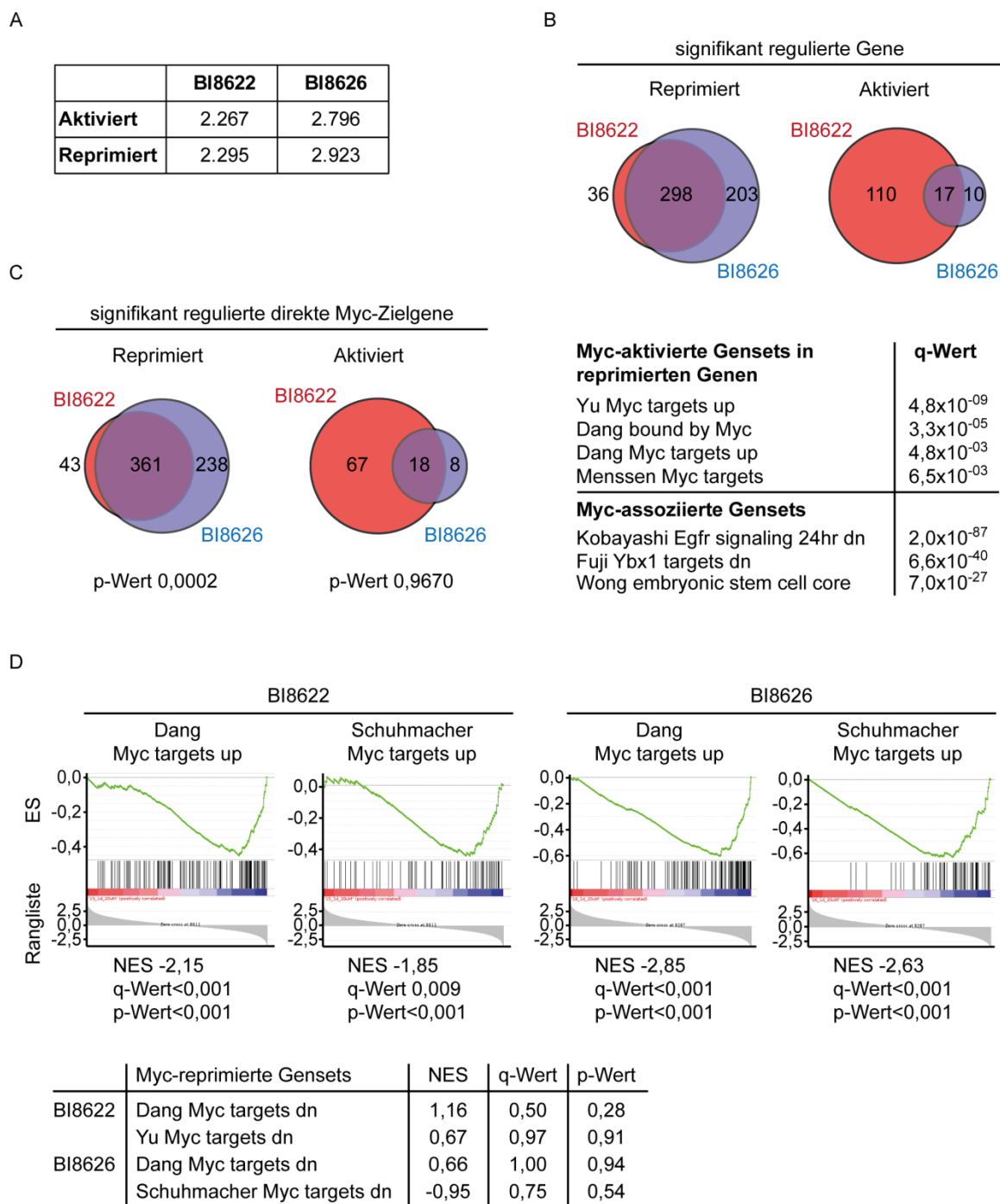


Abb. 4.15 Huwe1-Inhibition reprimiert genomweit die Expression von Myc-aktivierten Zielgenen¹

(A) Anzahl signifikant regulierter Gene nach Inhibition von Huwe1. Ls174T-Zellen wurden mit je 20 μ M BI8622 und BI8626 behandelt und 24 h später wurde die RNA isoliert und ein Microarray durchgeführt. Dargestellt ist die Anzahl signifikant aktivierter und reprimierter Gene für beide Inhibitoren. Als Schwellenwert wurde eine zweifache Genexpressionsänderung im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle angenommen (p -Wert<0,01).

(B) Venn-Diagramme einer Anreicherungsanalyse aller regulierten Gene nach Huwe1-Inhibition. Mit den signifikant hoch- und herunterregulierten Genen nach Inhibition von Huwe1 wurde eine Anreicherungsanalyse mit Gensets aus der MSigDB durchgeführt. Die Berechnung beruhte auf einer hypergeometrischen Verteilung. Es sind die Venn-Diagramme für Gensets gezeigt, in denen durch Huwe1-Inhibition reprimierte oder aktivierte Gene angereichert sind (oben). Die untere Tabelle gibt Beispiele von Myc-induzierten und weiteren Myc-

assoziierten Gensets an, die eine Anreicherung reprimierter Gene aufweisen (Fujii et al, 2008; Kobayashi et al, 2006; Menssen & Hermeking, 2002; Wong et al, 2008; Yu et al, 2005; Zeller et al, 2003).

(C) Venn-Diagramme einer Anreicherungsanalyse direkter Myc-Zielgene nach Huwe1-Inhibition. Die Analyse wurde wie in (B) beschrieben durchgeführt. Die signifikant regulierten Gene wurden vorher nach direkten Myc-Zielgenen gefiltert (Gene mit einer Myc-Bindestelle ± 2 kb von der TSS; ChIP-Seq-Datensatz aus HeLa-Zellen; Walz et al, 2014). p-Werte wurden mit Hilfe einer hypergeometrischen Verteilung berechnet.

(D) Anreicherungsplots einer GSEA der Microarray-Daten nach Huwe1-Inhibition. Dargestellt sind Beispiele von Anreicherungsplots von publizierten Myc-induzierten Gensets aus der MSigDB nach Inhibition von Huwe1 durch BI8622 und BI8626 (oben). Des Weiteren sind Beispiele für Myc-reprimierte Gensets angegeben (unten) (Schuhmacher et al, 2001; Yu et al, 2005; Zeller et al, 2003). ES: *enrichment score*; NES: *normalised enrichment score*.

4.3.6 Die Inhibition und Depletion von Huwe1 haben identische Effekte auf die Transaktivierungsfunktion von Myc

Anhand der einzelnen Microarray-Auswertungen für die Depletion und Inhibition von Huwe1 konnte davon ausgegangen werden, dass ähnliche Effekte auf die Expression Myc-aktivierter Gene erzielt wurden. Um dies zu bestätigen, wurde ein direkter Vergleich der Genexpressionsänderung mittels einer *heat map* erstellt (Abb. 4.16). Dafür wurden entweder alle Gene (links) oder Gene, die als direkte Myc-Zielgene definiert wurden (rechts), nach ihrer Expression bei Huwe1-Depletion sortiert. Die Inhibition von Huwe1 durch BI8622 und BI8626 hatte vergleichbare Effekte auf die Genexpression aller Gene wie die Depletion von Huwe1. Diese Beobachtung konnte auch für direkte Myc-Zielgene bestätigt werden und dies war in beiden Fällen statistisch signifikant, wie an den p-Werten abzulesen ist.

Es konnte geschlussfolgert werden, dass Inhibition und Depletion von Huwe1 identische Effekte auf die Genexpression im Allgemeinen und auch auf die Expression von Myc-Zielgenen zeigen. Damit wurde erneut die *on-target* Aktivität der Huwe1-Inhibitoren nachgewiesen.

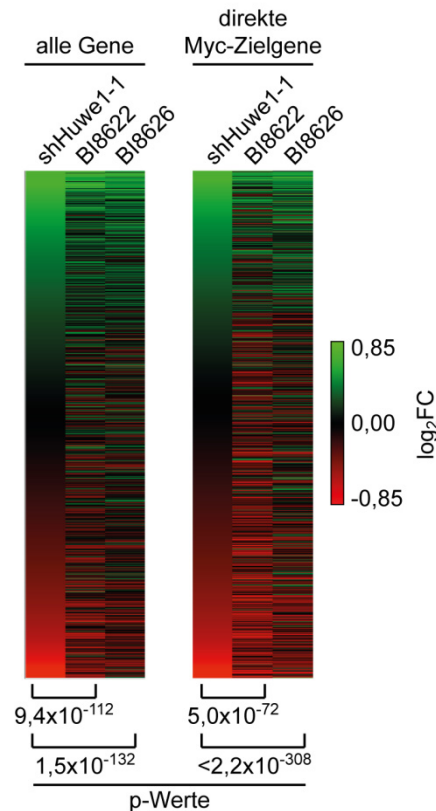


Abb. 4.16 Die Inhibition und Depletion von Huwe1 beeinflussen die Genexpression in gleicher Weise¹

Links sind die Genexpressionsänderungen aller Gene ($n=10.452$) dargestellt, sortiert nach ihrer Expression bei Depletion von Huwe1. Der rechte Teil der Abbildung zeigt Gene, die eine Myc-Bindestelle im Promoter besitzen (definiert als -1 kb bis +0,5 kb von der TSS, $n=5.664$). Die Bindedaten wurden aus einem ChIP-Seq-Datensatz aus HeLa-Zellen entnommen (Walz et al, 2014). p-Werte wurden als Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman angegeben.

4.3.7 Die Effekte der Huwe1-Inhibition sind unabhängig von p53

Wie in Abschnitt 4.1.4 erläutert, ist p53 ebenfalls als Zielprotein von Huwe1 beschrieben worden. Daher könnten der beobachtete Zellzyklusarrest sowie die Genexpressionsänderungen nach Inhibition von Huwe1 auch ein Resultat eines stabilisierten p53-Proteins sein. Für die Depletion von Huwe1 konnte dies schon ausgeschlossen werden, da keine Stabilisierung von p53 nachzuweisen war (s. Abschnitt 4.1.4). Dies sollte auch für die Inhibition von Huwe1 untersucht werden. Ls174T-Zellen wurden dafür mit beiden Inhibitorsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und 16 h später die Proteinmengen von p53 und den phosphorylierten Formen von Atm und Chk2 analysiert. Weder BI8622 noch BI8626 führten zu einer Induktion von p53 im Vergleich zur UV-behandelten Kontrolle (Abb. 4.17 A). Nach UV-Behandlung war zudem eine verstärkte

Phosphorylierung von Atm und Chk2 (p-Atm, p-Chk2) als Indikator einer aktiven p53-DNA-Schadensantwort nachzuweisen, die nach Inhibitorbehandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nicht vorhanden war. Etliche Myc-aktivierte Zielgene sind gleichzeitig auch p53-Zielgene oder werden im Zuge eines Zellzyklusarrests reprimiert. Um auszuschließen, dass die Repression dieser Gene nach Huwe1-Inhibition p53-vermittelt ist, wurde p53 mittels lentiviraler Infektion depletiert. Nach Depletion war die Expression von p53 auf mRNA-Ebene auf 13 % verringert (Abb. 4.17 B). Abbildung 4.17 C stellt die mRNA-Mengen einiger Myc-aktivierter Zielgene dar. In den Kontrollzellen war eine Repression der Myc-induzierten Zielgene *HSPE1*, *ODC1* und *CDC25A* nach Huwe1-Inhibition zu beobachten. Im Vergleich dazu wurde die Repression dieser Gene durch Inhibition von Huwe1 in p53-depletierten Zellen nicht aufgehoben. Damit wurde auch für die Inhibition von Huwe1 nachgewiesen, dass die gezeigten Genexpressionsänderungen nicht über p53 vermittelt wurden.

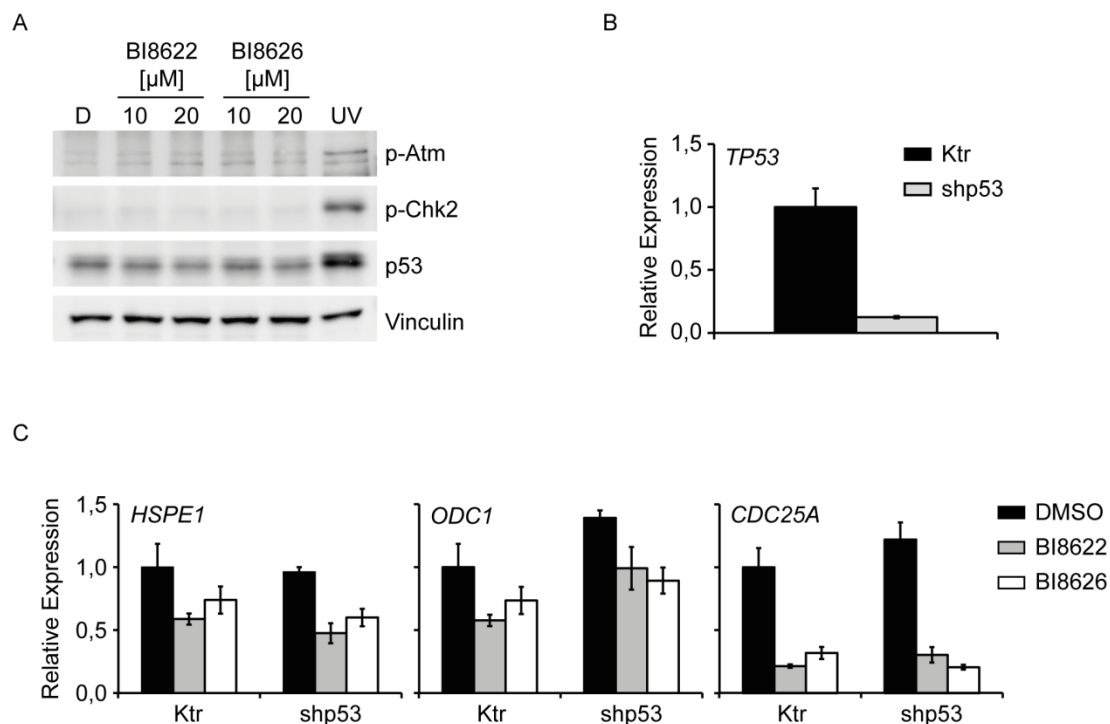


Abb. 4.17 p53 vermittelt nicht die Genexpressionsänderungen nach Huwe1-Inhibition¹

(A) Western Blot der p53-Proteinmenge nach Huwe1-Inhibition. Ls174T-Zellen wurden 16 h mit BI8622, BI8626 oder DMSO (D) als Kontrolle inkubiert. Als Positivkontrolle für die p53-Aktivierung wurden die Zellen eine Minute mit 500 J/m² UV-Licht (UV) bestrahlt und drei Stunden später geerntet. Die Proteinlysate wurden im Western Blot auf die Expression von p53, p-Atm und p-Chk2 untersucht. Vinculin diente als Ladekontrolle. (B) Depletion von p53 in Ls174T-Zellen. Die Zellen wurden mit einem Kontrollvirus (Ktr) oder einem Virus, der eine shRNA gegen p53 trägt, infiziert. Nach Selektion wurde die Depletion von p53 auf mRNA-Ebene

mittels qRT-PCR untersucht. Die Expression ist normalisiert auf das Gen *B2M*. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines Experiments.

(C) Expression von Myc-Zielgenen nach Huwe1-Inhibition in p53-depletierten Ls174T-Zellen. Das Experiment wurde wie in (B) beschrieben durchgeführt. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression der angegebenen Gene, normalisiert auf *B2M*, mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten.

4.4 Mechanistische Analyse der Huwe1-beeinflussten Myc-Transaktivierung

Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl die Depletion als auch die Inhibition von Huwe1 die Myc-induzierte Transaktivierung von Zielgenen reprimieren (Abschnitt 4.1 und 4.3). Um ein genaueres Verständnis zu erlangen, wie Huwe1 dies beeinflusst und damit auch wie die Inhibitorsubstanzen wirken, sollten im Folgenden mögliche Mechanismen analysiert werden.

4.4.1 Die Huwe1-induzierte Ubiquitinierung von Myc wird nicht durch Huwe1-Inhibition verringert

Es ist bereits bekannt, dass Myc und Huwe1 stöchiometrisch miteinander interagieren und Myc durch Huwe1 ubiquitiniert wird (Adhikary et al, 2005). Diese Ubiquitinierung ist nötig für die Transaktivierungsfunktion von Myc, da die Rekrutierung des Koaktivators p300 dadurch ermöglicht wird. Daher wäre eine plausible Erklärung für die Repression von Myc-Zielgenen nach Huwe1-Inaktivierung, dass die Huwe1-induzierte Ubiquitinierung von Myc gehemmt wird. Dafür sollte mit Hilfe einer exogenen Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) vorerst geprüft werden, ob die Interaktion zwischen Myc und Huwe1 durch Inhibitorbehandlung beeinflusst wird. Myc und HA- Δ N-Huwe1 wurden in HeLa-Zellen überexprimiert und die Zellen anschließend mit den Inhibitoren BI8622 und BI8626 behandelt. Im Input konnte die Überexpression von HA- Δ N-Huwe1 und Myc nachgewiesen werden und die Inhibitorbehandlung hatte keinen Einfluss auf die exogenen Proteinmengen (Abb. 4.18 A). Die IP erfolgte mit einem Antikörper gegen Myc, der sowohl endo- als auch exogenes Myc erfolgreich präzipitierte (Abb. 4.18 A, Spuren 7 und 10, „DMSO“). In beiden Fällen konnte eine Assoziation mit überexprimiertem Huwe1 gezeigt werden. Beide Immunpräzipitationen waren spezifisch, da in Proben mit unspezifischem IgG-Antikörper keine Signale im Western Blot detektiert wurden (Abb. 4.18 A, Spuren 1 - 6). Im Vergleich zur DMSO-behandelten

Kontrolle konnte keine Änderung in der Interaktion zwischen Myc und Huwe1 in Inhibitor-behandelten Proben beobachtet werden (Abb. 4.18 A, Spuren 8/9 und 11/12).

Die unveränderte Interaktion von Huwe1 und Myc nach Inhibitorbehandlung deutete darauf hin, dass Myc weiterhin durch Huwe1 ubiquitiniert werden kann. Um dies zu analysieren, wurden HeLa-Zellen mit Myc, His-Ubiquitin und HA-Huwe1 kotransfiziert und anschließend 24 h mit BI8622 oder BI8626 behandelt. His-Ubiquitin-modifizierte Proteine konnten präzipitiert und im Western Blot nachgewiesen werden (Ub-Myc). In DMSO-behandelten Zellen führte die Koexpression von His-Ubiquitin und Myc zu einer Ubiquitinierung von Myc, welche durch parallele Überexpression von HA-Huwe1 zunahm (Abb. 4.18 B, Spuren 1 - 3). Weder die Behandlung mit BI8622 noch mit BI8626 führte zu einer Abnahme der Huwe1-induzierten Ubiquitinierung von Myc (Abb. 4.18 B, Spuren 5 und 7).

Mit diesen Ergebnissen wurde nachgewiesen, dass die Huwe1-Inhibitoren weder die Interaktion zwischen Huwe1 und Myc noch die Huwe1-vermittelte Ubiquitinierung von Myc beeinflussen. Dadurch kann angenommen werden, dass die eingeschränkte Transaktivierungsfunktion von Myc nach Huwe1-Inhibition nicht aus einer veränderten Modifikation von Myc durch Huwe1 resultiert. Da zudem die Expression von Myc durch die Huwe1-Inhibitoren nicht verändert wurde (s. Abschnitt 4.3.3), lassen diese Resultate darauf schließen, dass Myc nicht das relevante direkte Zielprotein der Huwe1-regulierten Induktion von Myc-aktivierten Genen ist.

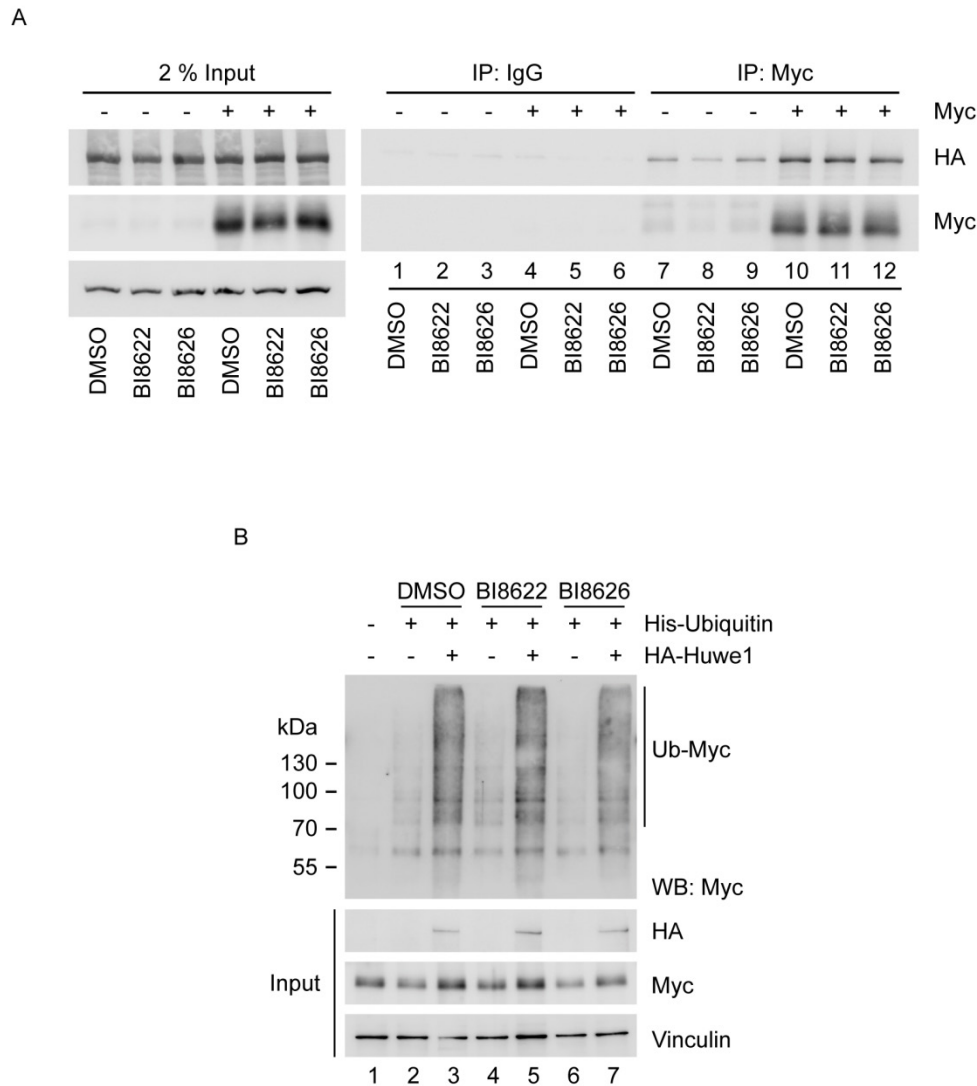


Abb. 4.18 Die Hemmung von Huwe1 inhibiert nicht die Huwe1-induzierte Ubiquitinierung von Myc

(A) Ko-Immunpräzipitation von Huwe1 und Myc nach Huwe1-Inhibition. HeLa-Zellen wurden mit Myc und HA-ΔN-Huwe1 transfiziert und 20 h mit BI8622 und BI8626 (je 10 μM) oder DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper gegen Myc (IP: Myc) oder einem unspezifischen anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (IP: IgG) durchgeführt. Präzipitierte Proteine wurden im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Als Input wurden 2 % des Gesamtlysates eingesetzt. Vinculin diente als Ladekontrolle.

(B) *In vivo* Ubiquitinierungsassay von Myc nach Inhibition von Huwe1. Myc, His-Ubiquitin und HA-Huwe1 wurden in HeLa-Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden parallel 24 h mit BI8622 und BI8626 (je 10 μM) behandelt, DMSO diente als Kontrolle. Nach der Ernte wurden die Zellen lysiert und Ubiquitin-modifizierte Proteine mittels Ni-NTA-Agarose präzipitiert. Als Input wurde 1 % des Gesamtlysates eingesetzt. Eluate und Input wurden im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Vinculin diente als Ladekontrolle.

4.4.2 Huwe1 beeinflusst die Proteinmenge von Miz1

Da die Effekte der Depletion und Inhibition von Huwe1 nicht durch Myc direkt vermittelt wurden, sollten weitere Substratproteine von Huwe1 auf eine potentielle Beteiligung in der Regulation der Myc-induzierten Genexpression analysiert werden. Eines dieser Zielproteine von Huwe1 ist die Histondeacetylase Hdac2, deren Destabilisierung ebenfalls durch die E3-Ligase bewirkt wird (Zhang et al, 2011a). Die Deacetylierung von Histonen trägt zu einer geschlosseneren Chromatinstruktur und damit zu einer inaktiven Transkription bei, somit kann Hdac2 an der Regulation der Genexpression beteiligt sein (Heinzel et al, 1997; Laherty et al, 1997). Allerdings hatten im in dieser Arbeit verwendeten Zellsystem weder die Inhibition noch die Depletion von Huwe1 einen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge von Hdac2 (Abb. 4.19 A, B). Dieses Resultat konnte auch durch eine transiente Überexpression von Huwe1 in HeLa-Zellen bestätigt werden, die nicht zu einer Abnahme an Hdac2-Protein führte (Laura Jänicke, persönliche Mitteilung). Ein weiteres Substratprotein von Huwe1 ist das Zinkfingerprotein Miz1. Huwe1 ubiquitiniert Miz1 und induziert somit dessen Abbau durch das Proteasom (Inoue et al, 2013; Yang et al, 2010). Außerdem bildet Myc mit Miz1 einen repressiven Komplex, der die Expression verschiedener Zielgene inhibiert (Übersicht in (Wiese et al, 2013)). Überexpressionsexperimente konnten nachweisen, dass Huwe1 zu einer Verringerung der Miz1-Proteinmenge führt (Laura Jänicke, persönliche Mitteilung). Um die Wirkung von Huwe1 auf Miz1 zu validieren, wurde Huwe1 in Ls174T-Zellen entweder durch die Substanzen BI8622 und BI8626 inhibiert oder durch eine shRNA depletiert. Im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollzellen zeigte sich eine 1,6- bis 2-fache Zunahme an Miz1-Protein nach Behandlung mit beiden Huwe1-Inhibitoren (Abb. 4.19 A). Ebenso führte die Depletion von Huwe1 zu einer 2,6-fachen Akkumulation von Miz1 verglichen mit Zellen einer Kontrollinfektion (Abb. 4.19 B).

Abschließend deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass Huwe1 die Proteinmenge von Miz1 in Kolonkarzinomzellen direkt beeinflusst und das akkumulierte Zinkfingerprotein somit an der Huwe1-regulierten Genexpression beteiligt sein könnte. Obwohl keine Änderung in der Gesamtmenge an Hdac2-Protein nach Inhibition oder Depletion von Huwe1 zu beobachten war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Huwe1-induzierte lokale Degradierung von Hdac2 an Myc-gebundenen Promotoren zur Transaktivierung beiträgt.

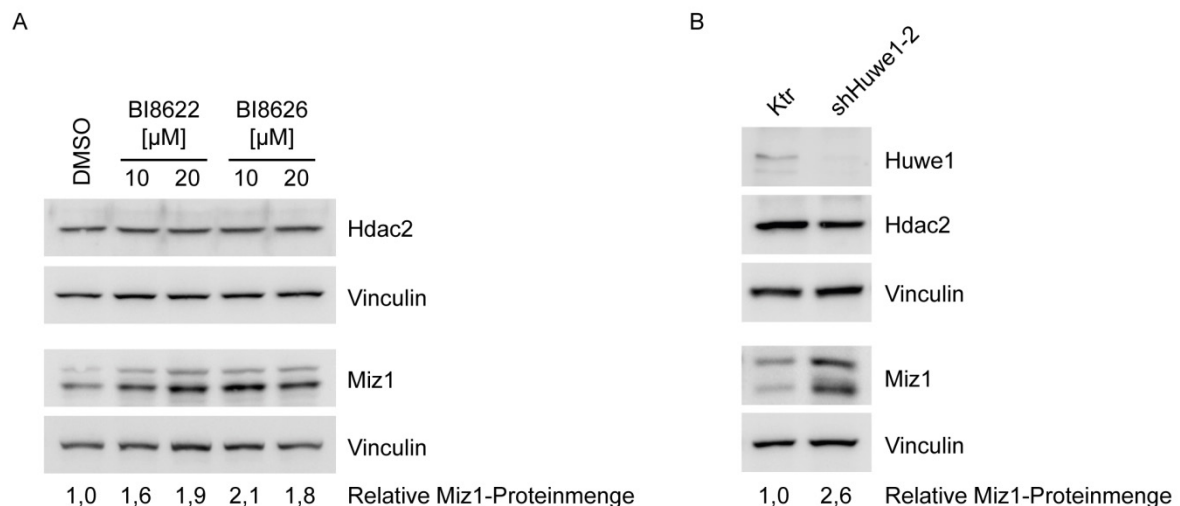


Abb. 4.19 Huwe1 reguliert die Proteinmenge von Miz1¹

(A) Proteinexpression von Miz1 und Hdac2 nach Inhibition von Huwe1. Ls174T-Zellen wurden mit den Inhibitorsubstanzen BI8622 und BI8626 in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO als Kontrolle behandelt. 24 h später wurden die Zellen geerntet und die Proteinlysate mittels Western Blot auf die Expression von Miz1 und Hdac2 untersucht. Vinculin diente als Ladekontrolle. Unter dem Western Blot ist die Quantifizierung der Miz1-Proteinmenge relativ zu Vinculin angegeben.

(B) Proteinmengen von Miz1 und Hdac2 nach Depletion von Huwe1. Ls174T-Zellen wurden mit Kontrollentiviren (Ktr) oder Lentiviren infiziert, die eine shRNA gegen Huwe1 tragen. Nach Selektion wurden die Zellen lysiert und die Western Blots der Proteinlysate mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Vinculin wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Darunter ist die Quantifizierung der Miz1-Proteinmenge bezogen auf Vinculin gezeigt.

4.4.3 Miz1 akkumuliert am direkten Miz1-Zielgen *VAMP4* und am Myc-aktivierten E-Box-Zielgen *HSPE1* nach Huwe1-Inhibition

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Zunahme an der Gesamtproteinmenge von Miz1 in einer Akkumulation des Transkriptionsfaktors an Zielpromotoren resultiert. Vor kurzem wurden direkte Zielgene von Miz1 identifiziert, die eine Konsensus-DNA-Bindesequenz besitzen (Wolf et al, 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Miz1 zwar nicht direkt an E-Boxen (die DNA-Bindesequenz für Myc) bindet, aber über die Interaktion mit Myc daran rekrutiert werden kann (Staller et al, 2001; Walz et al, 2014). Zur Analyse der Miz1-Bindung an direkte und indirekte Zielgene nach Huwe1-Inhibition wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation in Ls174T-Zellen (ChIP, s. Abschnitt 3.3.9) mit anschließender qRT-PCR durchgeführt. Für den ChIP wurde zusätzlich zu einem Antikörper gegen Miz1 ein anti-Histon-H3-Antikörper verwendet. Um experimentelle Variationen zwischen unterschiedlichen Chromatinproben auszugleichen, wurde der Miz1-ChIP darauf

normalisiert. Als direktes Zielgen von Miz1 wurde *VAMP4* ausgewählt, da dessen Promoter ein Miz1-Bindemotiv enthält und in Miz1-ChIP-Seq-Datensätzen aus HeLa-Zellen eine starke Miz1-Bindung zeigt (Walz et al, 2014). Wie in Abb. 4.20 (oben links) zu erkennen ist, konnte Miz1 am *VAMP4*-Promoter in DMSO-behandelten Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit den Inhibitorsubstanzen BI8622 und BI8626 nahm die Anreicherung von Miz1 signifikant zu. *HSPE1* ist ein direktes Zielgen von Myc und enthält eine Konsensus-E-Box-Sequenz (CACGTG) im Promoterbereich. Hier konnte ebenfalls eine Bindung von Miz1 an den Promoter gezeigt werden, die nach Inhibition von Huwe1 signifikant verstärkt wurde (Abb. 4.20, oben rechts). Die Anreicherung von Miz1 bezogen auf die IgG-Kontrolle bewegte sich dabei für beide Gene in einem Bereich von 30- bis 100-fach. Zur Kontrolle, ob es sich um spezifische Assoziationen von Miz1 mit diesen DNA-Sequenzen handelte, wurde sowohl ein Kontrollgen (*ACTB*) als auch eine intergenische Region (IR) auf Chromosom 11 untersucht. Wie zu erwarten war, zeigte sich in beiden Regionen in DMSO-behandelten Kontrollzellen keine Bindung von Miz1 (Abb. 4.20, unten). Die Prozent-Input-Werte am Promoter von *ACTB* erhöhten sich nach Inhibitorbehandlung ebenfalls signifikant, aber die Anreicherung relativ zur IgG-Kontrolle zeigte etwa zehnmal kleinere Werte als an der Transkriptionsstartstelle (TSS) von *VAMP4* und *HSPE1*. An der intergenischen Region war auch nach Huwe1-Inhibition keine Bindung von Miz1 festzustellen.

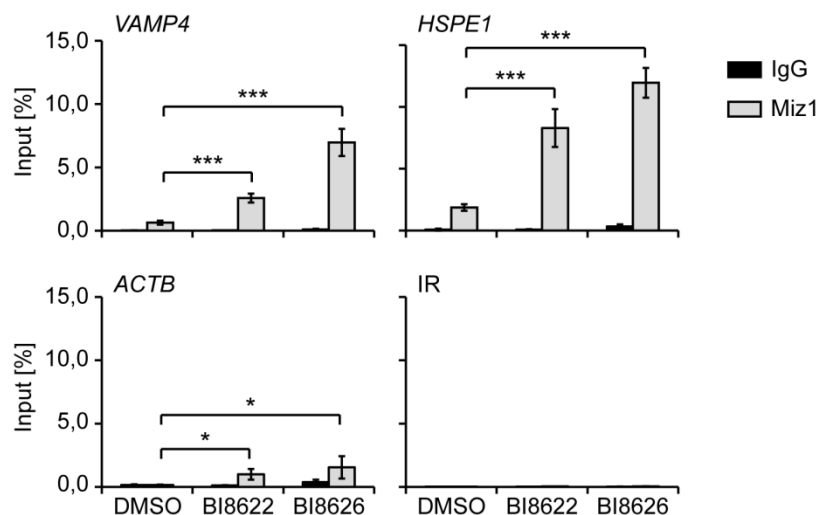


Abb. 4.20 Nach Huwe1-Inhibition akkumuliert Miz1 an den Promotoren der Gene *VAMP4* und *HSPE1*¹
Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) von Miz1 nach Inhibition von Huwe1. Ls174T-Zellen wurden mit BI8622 und BI8626 (je 20 µM) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Zur Immunpräzipitation wurde ein spezifischer Antikörper gegen Miz1, ein unspezifischer anti-IgG-Antikörper (Spezies Maus) oder ein Antikörper

gegen Histon H3 verwendet. Nach Elution und Aufreinigung der DNA wurde eine qRT-PCR mit Primern für die Promoterregionen des direkten Miz1-Zielgens *VAMP4*, des Konsensus-E-Box enthaltenden Myc-Zielgens *HSPE1* und für zwei unspezifische Kontrollregionen (*ACTB*, intergenische Region (IR)) durchgeführt. Die Prozent-Input-Werte wurden auf die Werte von Histon H3 normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=3). p-Werte wurden mit Hilfe eines Student's t-Test ermittelt (*p-Wert<0,05; ***p-Wert<0,001).

4.4.4 Die Huwe1-Inhibition beeinflusst die Histonacetylierung am *HSPE1*-Promoter

Mit den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen ChIP-Experimenten konnte die Akkumulation von Miz1 sowohl an einem direkten Miz1-Zielgen als auch einem Myc-aktivierten Zielgen gezeigt werden. Es stellte sich nun die Frage, ob auch Myc nach Huwe1-Inhibition vermehrt an diese Promotoren rekrutiert wird, obwohl die Gesamtproteinmenge an Myc von Huwe1 nicht beeinflusst wurde (s. Abschnitt 4.3.3). In Chromatin-Immunpräzipitationen von DMSO-behandelten Ls174T-Zellen konnte Myc sowohl am Promoter von *VAMP4* als auch von *HSPE1* nachgewiesen werden (Abb. 4.21 A). Im Gegensatz zu der beobachteten vermehrten Anreicherung von Miz1 an den beiden Promoterbereichen, konnten für die Myc-Bindung nur moderate Änderungen durch die Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 festgestellt werden. Am direkten Miz1-Zielgen *VAMP4* wurde die Myc-Bindung verringert, aber Myc war nach wie vor am Promoter gebunden. Dagegen zeigte sich eine etwa 1,6-fache Zunahme der Anreicherung am *HSPE1*-Promoter für den Inhibitor BI8622, während bei Behandlung mit BI8626 keine signifikante Änderung festgestellt werden konnte. Am Kontrollgen *ACTB* hatte die Inhibition von Huwe1 durch BI8626 eine verminderte Myc-Bindung zur Folge. In der intergenischen Kontrollregion (IR) konnte kein Myc nachgewiesen werden. Eine reprimierte Genexpression ist zumeist assoziiert mit einer Deacetylierung von Histonen, da dies zu einer geschlosseneren Struktur des Chromatins beiträgt. Myc kann die Acetylierung der Histone H3 und H4 durch Rekrutierung von Histonacetyltransferasen an Zielpromotoren induzieren (Bouchard et al, 2001; Eberhardy et al, 2000). Daher sollte zusätzlich die Acetylierung der Histone H3 und H4 (AcH3 und AcH4) im ChIP analysiert werden. Für das Myc-aktivierte Zielgen *HSPE1* wurde eine signifikante Abnahme der Acetylierung am Histon H3 nach Behandlung mit beiden Huwe1-Inhibitoren bestätigt (Abb. 4.21 B). BI8622, aber nicht BI8626, führte auch zu einer signifikanten Deacetylierung von Histon H4. Das Miz1-gebundene Gen *VAMP4* und das nicht-regulierte Gen *ACTB* zeigten unterschiedliche Resultate für beide Huwe1-Inhibitoren. An der TSS von *VAMP4* führte der Inhibitor BI8626 zu einer verminderten Acetylierung von

Histon H3, während die Acetylierung von Histon H4 weder von BI8622 noch von BI8626 beeinflusst wurde. Der Promoter von *ACTB* zeigte ebenfalls keine Änderung im Acetylierungszustand von Histon H4, dagegen induzierte BI8622 eine vermehrte Acetylierung von Histon H3. In der intergenischen Kontrollregion war keine Anreicherung von acetylierten Histonen zu beobachten.

Mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Huwe1 eine Deacetylierung von Histon H3 am Myc-aktivierten Zielgen *HSPE1* induziert. Die Myc-Bindung an der TSS von *HSPE1* änderte sich dagegen für beide Huwe1-Inhibitoren nicht konsistent. Die Resultate deuten daraufhin, dass die analysierte Repression der Expression von *HSPE1* (s. Abschnitt 4.3.4) mit einer verminderten Acetylierung korreliert, aber nicht durch den Verlust der Interaktion von Myc mit dem Promoter verursacht wird.

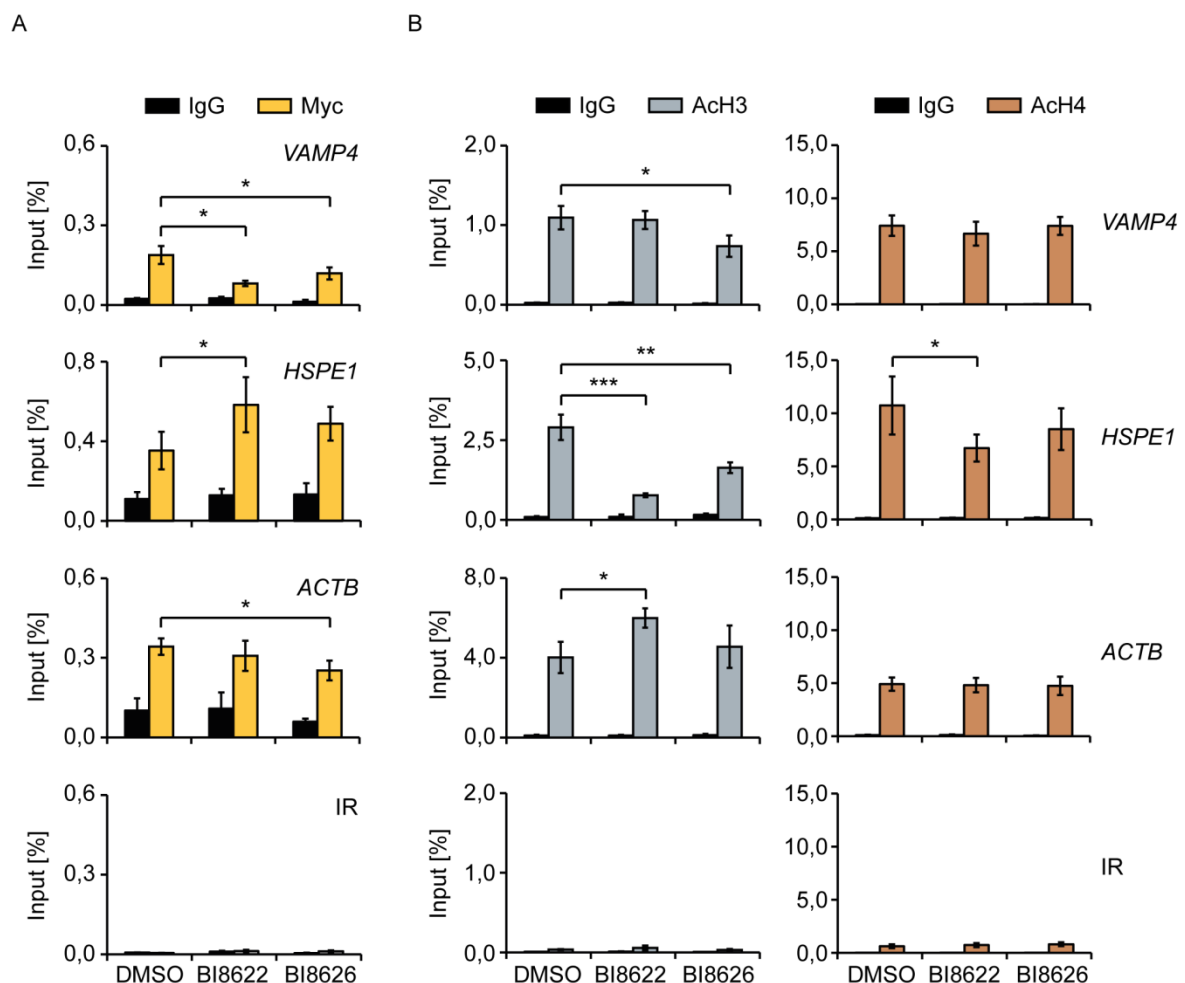


Abb. 4.21 Die Acetylierung von Histon H3 am *HSPE1*-Promoter wird durch Huwe1-Inhibition verringert¹

(A) Analyse der Myc-Bindung nach Inhibition von Huwe1. Nach Behandlung von Ls174T-Zellen mit DMSO als Kontrolle oder den Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 (je 20 μ M) wurde ein ChIP mit spezifischen Antikörpern gegen Myc oder einem unspezifischen IgG-Antikörper (Spezies Kaninchen) durchgeführt. In einer anschließenden qRT-PCR wurde die Anreicherung in den Promoterbereichen von *VAMP4*, *HSPE1* und *ACTB* untersucht. Eine intergenische Region (IR) diente als Kontrollregion. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines Experiments gezeigt (n=3). Die Prozent-Input-Werte wurden auf präzipitiertes Histon H3 normalisiert. p-Werte wurden mit einem Student's t-Test berechnet (*p-Wert<0,05).

(B) Acetylierung der Histone H3 und H4 nach Huwe1-Inhibition. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt. Zur Immunpräzipitation wurden spezifische Antikörper gegen die acetylierten Formen der Histone H3 und H4 (AcH3 und AcH4) verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=3). p-Werte wurden mit einem Student's t-Test berechnet (*p-Wert<0,05; **p-Wert<0,01; ***p-Wert<0,001).

4.4.5 Die Depletion von Huwe1 induziert eine Deacetylierung von Histon H3 am *HSPE1*-Promoter

Die Repression der Myc-aktivierten Transkription des Gens *HSPE1* konnte auch bei Depletion von Huwe1 gezeigt werden (s. Abschnitt 4.1.3). Daher sollte geprüft werden, ob die bei Huwe1-Inhibition beobachtete signifikante Deacetylierung von Histon H3 am *HSPE1*-Promoter auch in Huwe1-depletierten Ls174T-Zellen nachgewiesen werden kann und wie sich die Myc-Bindung verhält. Vergleichbar zur Inhibition von Huwe1 bestätigten Chromatin-Immunpräzipitationen von acetyliertem Histon H3, dass die Depletion von Huwe1 eine signifikante Deacetylierung an der TSS des *HSPE1*-Gens auslöste (Abb. 4.22, links). Dahingegen war keine Änderung im Acetylierungszustand von Histon H3 an einem Kontrollpromoter (*ACTB*) zu erkennen (Abb. 4.22, rechts). Des Weiteren wurde die Assoziation von Myc mit den beiden Promoterbereichen in Huwe1-depletierten Zellen analysiert. Weder an der TSS von *HSPE1* noch von *ACTB* wurde die Bindung von Myc durch die Depletion von Huwe1 beeinflusst (Abb. 4.22). Daraus kann geschlossen werden, dass sowohl die Inhibition als auch die Depletion von Huwe1 die Rekrutierung von Myc an Promotoren Myc-aktivierter Zielgene nicht konsistent verändert, aber die verminderte Acetylierung von Histon H3 zur gehemmten Transkription dieser Gene beiträgt.

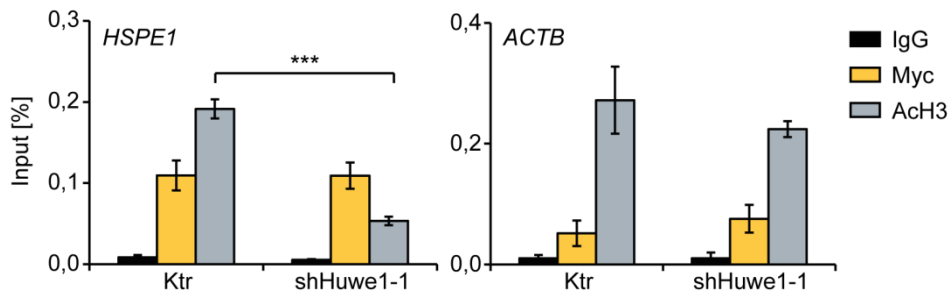


Abb. 4.22 Die Acetylierung von Histon H3 wird durch Huwe1-Depletion vermindert¹

Myc-Bindung und Acetylierung von Histon H3 nach Huwe1-Depletion. Huwe1 wurde mittels einer shRNA in Ls174T-Zellen depletiert, als Kontrolle diente eine unspezifische shRNA-Sequenz (Ktr). Es wurde ein ChIP mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt, wobei ein unspezifischer IgG-Antikörper (Spezies Kaninchen) als Kontrolle eingesetzt wurde. Anschließend wurde mittels einer qRT-PCR die Anreicherung an den Promoterregionen der Gene *HSPE1* und *ACTB* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten eines Experiments (n=2). p-Werte wurden mit einem Student's t-Test berechnet (**p-Wert<0,001).

4.4.6 Die Expression direkter Miz1-Zielgene wird nicht durch Huwe1 reguliert

Bisher konnte validiert werden, dass die Inaktivierung von Huwe1 die Repression direkter Myc-aktivierter Zielgene auslöst, wobei eine Deacetylierung an Histonen stattfindet. Da keine konsistente Änderung im Acetylierungszustand der Histone H3 und H4 an dem direkten Miz1-Zielgen *VAMP4* nach Inhibition von Huwe1 nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob dessen Expression von Huwe1 beeinflusst wird. Keiner der beiden Huwe1-Inhibitoren führte zu einer Expressionsänderung von *VAMP4* (Abb. 4.23 A). Zudem war *VAMP4* nicht unter den regulierten Genen des Microarray-Experiments nach Depletion von Huwe1 (s. Abschnitt 4.1.3) zu finden. Um zu untersuchen, ob Huwe1 generell die Expression Miz1-gebundener Zielgene reguliert, wurde eine GSEA mit den Microarray-Datensätzen sowohl der Inhibition als auch der Depletion von Huwe1 ausgeführt (Susanne Walz). Dafür wurde ein Genset definiert, welches Gene mit direkten Myc/Miz1-gebundenen Promotoren in HeLa-Zellen enthält (Walz et al, 2014). Zusätzlich sind diese Gene durch ein konserviertes Miz1-Motiv definiert. Wie in Abb. 4.23 B zu erkennen ist, waren durch Huwe1-Inaktivierung beeinflusste Gene nicht signifikant im Miz1-Genset angereichert. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Huwe1 keinen Einfluss auf die Expression von direkten Miz1-Zielgenen hat.

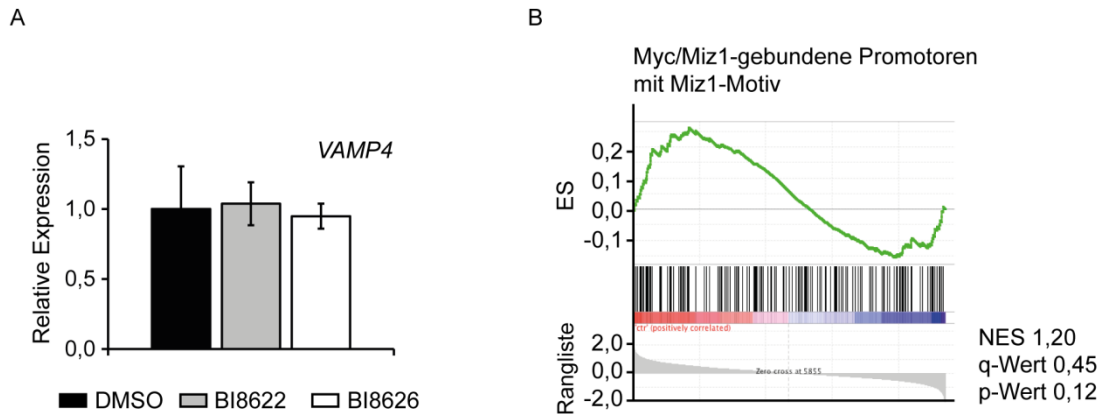


Abb. 4.23 Huwe1 hat keinen Einfluss auf die Expression direkter Zielgene von Miz1

Anreicherungsplot einer GSEA, der die Expression von direkten Miz1-Zielgenen nach Inhibition und Depletion von Huwe1 dokumentiert. Die Genexpressionsdaten nach Inhibition und Depletion von Huwe1 wurden hierbei wie biologische Replikate behandelt. Das verwendete Genset wurde aus ChIP-Seq-Datensätzen für Myc und Miz1 in HeLa-Zellen erstellt und mit Hilfe des konservierten Miz1-Bindemotivs nach direkten Miz1-Zielgenen gefiltert (Walz et al, 2014). ES: *enrichment score*; NES: *normalised enrichment score*.

Abschließend konnte nachgewiesen werden, dass die Inaktivierung von Huwe1 die Proteinmenge von Miz1 sowohl an Myc-induzierten als auch an Miz1-Zielgenen erhöht. Dies führt zu einer Repression der Myc-Transaktivierung, die gekennzeichnet ist durch eine verringerte Acetylierung von Histon H3 an E-Box-Zielgenen von Myc, während direkte Miz1-Zielgene nicht reguliert werden.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle von Huwe1 in der Karzinogenese - Onkoprotein oder Tumorsuppressor?

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Inhibition von Huwe1 ein möglicher Ansatz für die Therapie des Kolonkarzinoms ist. Bisherige Publikationen diskutieren kontrovers, ob Huwe1 eher onkogene oder tumorsuppressive Eigenschaften besitzt. So wird p53, eines der wichtigsten Tumorsuppressorproteine, von Huwe1 ubiquitiniert und proteasomal degradiert. Die Depletion von Huwe1 führt in mehreren zellulären Systemen zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose (Chen et al, 2005; Qi et al, 2012). Dagegen hat Huwe1 in Neuroblastomzellen keinen Einfluss auf die Proteinmenge von p53 (Zhao et al, 2008). Das anti-apoptotische Protein Mcl1 ist ebenfalls ein Substrat von Huwe1 und Huwe1-defiziente Zellen zeigen eine Akkumulation von Mcl1, was zu einem verstärkten Überleben der Zellen führt (Zhong et al, 2005). Dabei muss berücksichtigt werden, dass dies ein Mechanismus ist, der erst durch einen DNA-Schaden induziert wird, während die Assoziation zwischen Huwe1 und p53 auch in ungestressten Zellen auftritt. In einem Mausmodell der Hautkarzinogenese konnte nachgewiesen werden, dass die Deletion von Huwe1 über die Bildung eines repressiven Miz1/Myc-Komplexes zu einer vermehrten Proliferation von Keratinozyten und einem verstärkten Hauttumorwachstum führt (Inoue et al, 2013). Dies argumentiert für ein tumorsuppressives Potential von Huwe1. Es ist daher wahrscheinlich, dass Huwe1 je nach zellulärem Kontext unterschiedliche Funktionen erfüllt. Trotz dieser Beobachtungen ist zu betonen, dass Huwe1 in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen überexprimiert ist, darunter auch im Kolonkarzinom (Adhikary et al, 2005; Confalonieri et al, 2009; Yoon et al, 2005). Während der kolorektalen Karzinogenese ist die Deregulation der Expression und Funktion des Onkoproteins Myc als eines der bedeutendsten Ereignisse identifiziert worden (Cancer Genome Atlas, 2012). Zudem besteht eine stöchiometrische Interaktion zwischen Huwe1 und Myc, die in der Ubiquitinierung und Aktivierung von Myc resultiert (Adhikary et al, 2005). Diese Faktoren weisen auf die onkogenen Eigenschaften von Huwe1 im Kolonkarzinom hin. Daher könnte die Inhibition der Myc-Funktion über die Repression von Huwe1 anti-tumorale Effekte im Kolonkarzinom zeigen.

5.1.1 Das Wachstum subkutaner und orthotoper Tumore der Kolonkarzinomzelllinie Ls174T ist abhängig von Huwe1

Im Gegensatz zum im vorhergehenden Abschnitt erwähnten Mausmodell der Hautkarzinogenese, in dem Huwe1 als Tumorsuppressor identifiziert wurde (Inoue et al, 2013), sind bisher keine *in vivo* Daten zur Rolle von Huwe1 in der kolorektalen Karzinogenese bekannt. Mit den von Jennyfer Bultinck zur Verfügung gestellten Resultaten konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Deletion von Huwe1 das Wachstum sowie die Metastasierung von Kolonkarzinomen hemmen kann (s. Abschnitt 4.1.2). Dies wurde mit Hilfe eines Xenograft-Mausmodells bestätigt, bei dem Zellen der kolorektalen Tumorzelllinie Ls174T, die eine induzierbare shRNA gegen Huwe1 tragen, subkutan injiziert wurden. Die Doxyzyklin-induzierte Depletion von Huwe1 hemmte das Tumorwachstum (Abb. 4.3 A, B). Der Vorteil von subkutanen Modellen besteht darin, dass die Zellen einfach zu implantieren sind und das Tumorwachstum direkt durch Vermessung dokumentiert werden kann. Allerdings spiegeln subkutane Modelle weniger die physiologischen Gegebenheiten der jeweiligen Tumore wider. Hier ist die Anwendung orthotoper Tumormodelle vorteilhaft, da die Zellen in das jeweilige Organ implantiert werden, in dem der Tumor seinen Ursprung hat. Dadurch entwickeln sich orthotope Tumore in ihrer ursprünglichen Umgebung und sie besitzen somit biologische Eigenschaften, die klinischen Fällen ähnlich sind. Dafür wurden Ls174T-Zellen direkt in die Muskulatur des Caecums implantiert, worauf sich Primärtumore im Kolon bildeten (Abb. 4.3 C, rechts). Die Beobachtung des Tumorwachstums konnte hier nicht direkt von außen geschehen, die Zellen exprimierten aber das Enzym Luciferase, wodurch ein *in vivo imaging* möglich war. Über die Messung der Luciferaseaktivität konnte sowohl die Entwicklung der Primärtumore als auch die Metastasierung in umliegende Organe verfolgt werden (Abb. 4.3 C, rechts). Auch in diesem orthotopen Tumormodell führte die Depletion von Huwe1 zur Inhibition des Tumorwachstums sowie der Metastasierung (Abb. 4.3). Damit wurde das onkogene Potential von Huwe1 im kolorektalen Karzinom *in vivo* validiert und weiterführende Studien müssten klären, inwieweit spezifische Inhibitoren von Huwe1 tumortheraeutische Erfolge erzielen könnten.

5.2 Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Bisherige Studien haben eine Reihe von Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) identifiziert (Übersicht in (Micel et al, 2013)). Eines der erfolgreichsten Beispiele der Inhibition des UPS zur Tumorthherapie ist der Proteasominhibitor Bortezomib (Velcade™, Millenium Pharmaceuticals), der 2003 erstmalig zur Behandlung des multiplen Myeloms zugelassen wurde (Kane et al, 2003). Das Proteasom erkennt polyubiquitinierte Proteine und degradiert sie. Durch eine Inhibition der proteasomalen Aktivität kommt es zu einer Akkumulation vieler Proteine unterschiedlicher Funktion, was Konflikte auf zellulärer Ebene und damit Zellzyklusarrest und Apoptose induziert (Übersicht in (Sterz et al, 2008)). Obwohl Bortezomib und die weiterentwickelten Analoga erfolgreich eingesetzt werden, weisen diese Substanzen nach wie vor Probleme wie Toxizitäten und Resistenzen auf (Übersicht in (Shen et al, 2013)). Da die Hemmung des Proteasoms zudem wenig spezifisch ist, gelten E3-Ubiquitin-Ligasen als attraktive Zielproteine einer Inhibition, da jede E3-Ligase eine definierte Anzahl an spezifischen Substraten besitzt. Die am besten charakterisierten E3-Ligase-Inhibitoren sind die Nutline (Roche). Diese interagieren mit der E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2 an der Bindestelle für p53, sodass p53 nicht mehr ubiquitiniert und degradiert werden kann, was wiederum zum p53-induzierten Proliferationsarrest und zur Apoptose führt. Nutlin-3 zeigt in verschiedenen Karzinomzelllinien sowie in Osteosarkom-Xenograft-Experimenten in Mäusen anti-proliferative Effekte (Endo et al, 2011; Roh et al, 2011; Vassilev et al, 2004). Darüber hinaus gibt es zwei Publikationen, in denen die E3-Ligase Skp2 durch niedermolekulare Substanzen inhibiert wird (Chan et al, 2013; Wu et al, 2012). Diese führen u. a. zur Akkumulation des Zellzyklusinhibitors p27 und einem darauffolgenden Proliferationsarrest und Seneszenz. Da die erwähnten E3-Ubiquitin-Ligasen zu der Gruppe von Ligasen gehören, die keine enzymatische Aktivität besitzen, hemmen die identifizierten Inhibitoren Protein-Protein-Interaktionen. Huwe1 gehört dagegen zur Familie der HECT-E3-Ligasen und besitzt ein aktives Zentrum mit einem katalytisch aktiven Cystein. Dies macht es möglich, die enzymatische Aktivität direkt zu beeinflussen.

5.3 Ein *in vitro* Auto-Ubiquitinierungsassay führte zur Identifikation von spezifischen niedermolekularen Huwe1-Inhibitoren

Es gibt verschiedene Möglichkeiten E3-Ubiquitin-Ligase-Inhibitoren zu identifizieren. Zum einen kann dies Substrat-abhängig geschehen, indem die Ubiquitinierungsreaktion eines Zielproteins durch die jeweilige E3-Ligase gemessen wird. Zum anderen kann die Messung Substrat-unabhängig erfolgen, dann wird die Auto-Ubiquitinierung der E3-Ligase analysiert. Dies kann z. B. über einen FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)-Assay oder über einen DELFIA (*dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay*)-Assay geschehen. Zur Identifikation der Huwe1-Inhibitoren wurde ein DELFIA-System von Boehringer Ingelheim angewendet, in dem biotinyliertes Huwe1-Peptid (bestehend aus der etwa 350 Aminosäuren großen HECT-Domäne) mit Myc-markiertem Ubiquitin und den Faktoren der Ubiquitinierungsreaktion (Uba1, UbcH5b, ATP) inkubiert wurde. Die Auto-Ubiquitinierung wurde mit Hilfe eines fluoreszierenden Europium-markierten Myc-Antikörpers detektiert. Der Screen wurde mit 840.243 Substanzen durchgeführt, von denen 2.765 die Auto-Ubiquitinierung inhibierten. Da sowohl ein E1- als auch E2-Enzym (Uba1 und UbcH5b) an der *in vitro* Reaktion beteiligt war, bestand die Möglichkeit, dass diese beiden Proteine von den Substanzen inhibiert werden. Über einen Thioesterassay, in dem die Assoziation zwischen Ubiquitin und UbcH5b in Anwesenheit von Uba1 gemessen wird, wurden dabei aktive Substanzen eliminiert (Michael Gmachl, persönliche Mitteilung). Die HECT-Domäne ist zwischen den verschiedenen HECT-E3-Ligasen hochkonserviert, sodass zusätzlich ausgeschlossen werden musste, dass andere HECT-E3-Ligasen inhibiert werden. Es wurden Dosis-Wirkungs-Kurven aufgenommen, mit denen gegenüber anderen HECT-E3-Enzymen aktive Inhibitoren ebenfalls aussortiert wurden (Abb. 5.1 A, Michael Gmachl, persönliche Mitteilung). Die Aktivität der HECT-E3-Ligasen und vieler anderer Enzyme wird durch eine reaktive Thiolgruppe des Cysteins im aktiven Zentrum bestimmt (s. Abschnitt 1.5.1). Das Problem solch reaktiver Thiolgruppen besteht darin, dass Inhibitorsubstanzen als unspezifische Elektrophile damit reagieren und diese somit die Aktivität jeglicher Enzyme hemmen können (Übersicht in (Wall et al, 2014)). Mit den beschriebenen *in vitro* Analysen wurde sichergestellt, dass spezifisch Huwe1 inhibiert wird, da eine fehlende Spezifität nicht kalkulierbare *off-target* Effekte hätte. In dieser Arbeit wurden die Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 analysiert, die niedrige *in vitro* IC₅₀-Werte im einstelligen, mikromolaren Bereich zeigen (Abb. 5.1 B). Diese IC₅₀-Werte liegen im

Bereich von mehreren experimentellen Substanzen, die zur erfolgreichen Inhibition von Skp2 oder auch des deubiquitinierenden Enzyms Usp7 eingesetzt werden und unterschreiten teilweise die in den Studien verwendeten Konzentrationen (Chan et al, 2013; Fan et al, 2013; Reverdy et al, 2012). Über die biochemische Wirkungsweise der zwei Substanzen ist bisher nichts bekannt. Versuche, die HECT-Domäne von Huwe1 mit den Inhibitoren BI8622 und BI8626 zu kristallisieren, waren nicht erfolgreich (Michael Gmachl, persönliche Mitteilung). Es kann vermutet werden, dass die Huwe1-Inhibitoren das Cystein des aktiven Zentrums blockieren oder aber eine allosterische Wirkung aufweisen und die für die Aktivität nötige Konformationsänderung der HECT-Domäne hemmen. Dies muss durch weiterführende Studien geklärt werden.

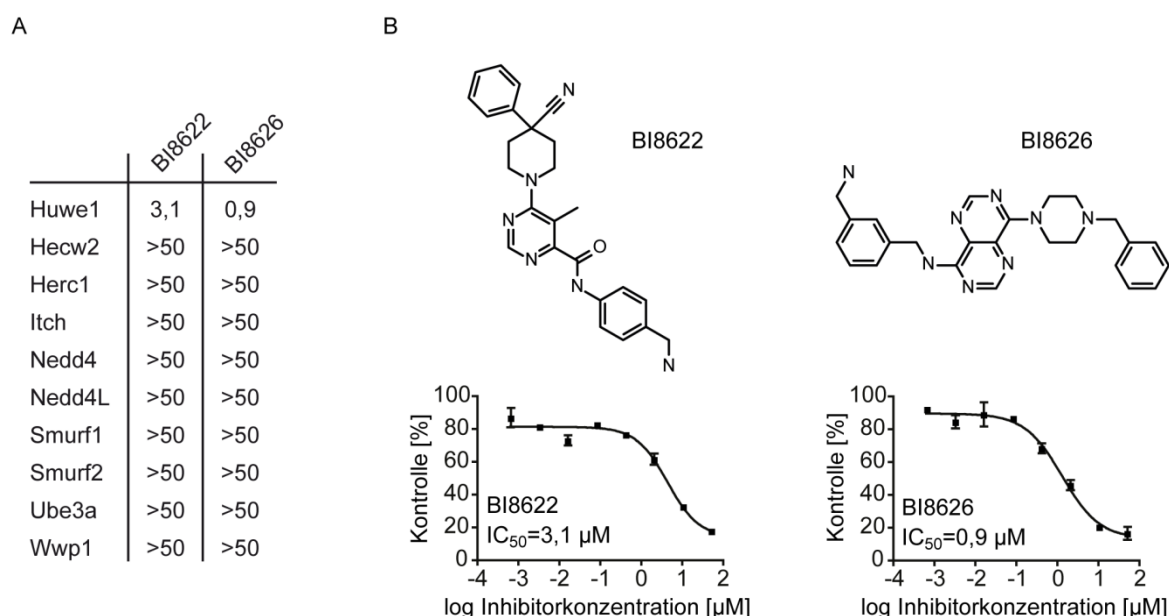


Abb. 5.1 Niedermolekulare Inhibitoren von Huwe1

(A) IC₅₀-Werte der Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 in den *in vitro* Auto-Ubiquitinierungsassays von Huwe1 und anderer HECT-E3-Ubiquitin-Ligasen.

(B) Strukturen der Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 (oben). Unten sind die zugehörigen Dosis-Wirkungs-Kurven von BI8622 und BI8626 dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=2).

Die Analyse der *in vivo* Spezifität der Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 erfolgte mit Hilfe zweier Substratproteine von Huwe1, Mcl1 und TopBP1, die durch Huwe1 ubiquitiniert und infolgedessen proteasomal degradiert werden (s. Abschnitt 1.5.4) (Herold et al, 2008; Zhong et al, 2005). TopBP1 ist normalerweise an der Steuerung der DNA-Replikation und

der Atr-vermittelten DNA-Schadensantwort beteiligt (Delacroix et al, 2007; Kumagai et al, 2006). Herold und Kollegen konnten zeigen, dass Miz1 die Lokalisation einer Fraktion von TopBP1 an Chromatin vermittelt (Herold et al, 2008). Chromatingebundenes TopBP1 wird vor der Ubiquitinierung und dem Abbau durch Huwe1 geschützt und induziert somit den Atr-Signalweg. Lösliches TopBP1 dagegen wird durch Huwe1 ubiquitiniert und proteasomal degradiert, was in einer verminderten Atr-Signaltransduktion resultiert. Die Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 induzierten eine Akkumulation von löslichem TopBP1 (Abb. 4.9). Dies könnte in einer verstärkten UV-induzierten Atm/Atr-Signaltransduktion resultieren, was aber in dieser Arbeit nicht genauer untersucht wurde. Zusätzlich führten die Substanzen BI8622 und BI8626 sowohl zu einer verminderten Ubiquitinierung als auch zu einer Stabilisierung von Mcl1 nach UV-Behandlung (Abb. 4.8). Da Mcl1 als anti-apoptotisches Protein die Zellen so vor Apoptose schützen sollte, könnte dies ein limitierender Faktor im therapeutischen Potential von Huwe1 sein (s. Abschnitt 5.1). Allerdings wurden die Experimente zur Stabilisierung von Mcl1 in der Osteosarkomzelllinie U2OS, und nicht in kolorektalen Karzinomzelllinien, durchgeführt und es wurde nicht getestet, ob durch die Huwe1-Inhibition Apoptose tatsächlich gehemmt wird. Zudem ist der Abbau von Mcl1 ein spezifischer, durch einen DNA-Schaden ausgelöster Prozess. Es ist somit möglich, dass Huwe1 in verschiedenen zellulären Kontexten und physiologischen Konditionen die jeweiligen Substratproteine differentiell reguliert, sodass der potentielle Einsatz der Huwe1-Inhibitoren als Tumorthapeutika vom zellulären System abhängig ist. Mit beiden Experimenten konnte zusammengefasst validiert werden, dass die Inhibition von Huwe1 über die Substanzen BI8622 und BI8626 in Zellen möglich ist.

5.4 Die Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 sind potentielle Tumorthapeutika im Kolonkarzinom

5.4.1 Huwe1 wird für die Proliferation von Kolonkarzinomzelllinien benötigt

In Zellkulturexperimenten konnte die Abhängigkeit der Proliferation verschiedener kolorektaler Karzinomzelllinien von Huwe1 validiert werden. In allen getesteten Zelllinien (Ls174T, HCT116, HT-29 und SW480) induzierte die Depletion von Huwe1 oder Inhibition durch die Substanzen BI8622 und BI8626 einen Proliferationsarrest, wie an den Kristallviolett-färbungen ersichtlich ist (Abb. 4.1 und Abb. 4.2; Abb. 4.10). Die dabei in

Ls174T-Zellen ermittelten IC_{50} -Werte für BI8622 (8,7 μ M) und BI8626 (3,7 μ M) lagen ebenfalls im einstelligen mikromolaren Bereich wie die Zahlen der *in vitro* Analysen, waren aber etwa höher. Bisher sind keine Daten zur Zellpermeabilität oder Metabolisierung der Huwe1-Inhibitoren bekannt, dies kann aber zu einer geringeren *in vivo* Reaktivität beitragen. Aus den Kristallviolett-färbungen ist nicht ersichtlich, in welcher Phase des Zellzyklus der Arrest stattfindet oder ob auch apoptotische Effekte eine Rolle spielen. Die Zellzyklusanalyse nach Huwe1-Inhibition mittels BrdU-PI-FACS und einer Wachstumskurve in Ls174T-Zellen zeigte, dass alle Phasen des Zellzyklus verlängert waren, die verminderte Proliferation aber vorrangig auf einem Arrest in der G1-Phase beruhte (Abb. 4.11 A - C). Apoptotische Effekte waren dabei nicht zu beobachten. Wie aus der Wachstumskurve und der Seneszenzfärbung ersichtlich ist, handelte es sich dabei um einen reversiblen Proliferationsarrest (Abb. 4.11 C, D). Man könnte argumentieren, dass ein reversibler Effekt der Huwe1-Inhibitoren ein weniger effektives Mittel zur Tumorthherapie ist als Apoptose oder ein irreversibler Proliferationsarrest. Unter der Vielzahl von identifizierten Huwe1-Inhibitoren zeigten in anfänglichen Analysen mehrere Substanzen auch apoptotische Effekte (Frauke Debus, Diplomarbeit und Daten nicht gezeigt). Diese wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da das Ziel dieses Projekts vorrangig darin bestand, die Inhibition von Huwe1 als *proof-of-principle* zur Hemmung der Myc-Funktion und der kolorektalen Karzinogenese zu etablieren. Außerdem sollte der zu Grunde liegende Mechanismus genauer beleuchtet werden.

Die untersuchten Zelllinien unterscheiden sich teilweise in den identifizierten genetischen Veränderungen. Während Ls174T- und HCT116-Zellen funktionelles Wildtyp-p53 besitzen, sind die Zelllinien HT-29 und SW480 dagegen durch Punktmutationen im *TP53*-Gen gekennzeichnet, die in einem nicht-funktionellen p53-Protein resultieren (Ahmed et al, 2013). Dies deutet darauf hin, dass die anti-proliferativen Effekte durch Inaktivierung von Huwe1 nicht oder nicht ausschließlich durch p53 vermittelt werden. In allen Zelllinien wurden aber Mutationen in den Proteinen Apc oder β -Catenin identifiziert (Ilyas et al, 1997). Die beiden Proteine sind essentielle Regulatoren des Wnt-Signalwegs und darüber an der kolorektalen Karzinogenese beteiligt. Die konstitutive Aktivierung der Signalkaskade führt zur Überexpression von Zielgenen wie *MYC*, das einer der wichtigsten Effektoren bei der Apc-/ β -Catenin-vermittelten Tumorentstehung ist (Cancer Genome Atlas, 2012; Sansom et al, 2007). Für Ls174T-Zellen wurde die Abhängigkeit von Myc genauer beschrieben: Die verminderte

Expression von Myc resultiert in einem Zellzyklusarrest und der Differenzierung der Zellen (van de Wetering et al, 2002). Auch in anderen Tumorzelllinien konnte die Rolle von Myc und Huwe1 in der Regulation der Proliferation bestätigt werden. Sowohl eine Zervixkarzinomzelllinie (HeLa) als auch eine Mammarkarzinomzelllinie (T47D) zeigten nach Depletion von Myc oder Huwe1 ein verlangsamtes Wachstum (Adhikary et al, 2005). In Zellen, in denen dagegen die Herunterregulation von Myc keine Auswirkungen hatte (MCF7 und MRC-5), bewirkte auch die Depletion von Huwe1 keine Änderung in der Proliferationsrate. Das legt die Vermutung nahe, dass Myc der zentrale Mediator des Proliferationsstops nach Inaktivierung von Huwe1 ist.

5.4.2 Huwe1 hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von Myc, aber reguliert die Transaktivierung von Myc-Zielgenen

Eine der wichtigsten Funktionen von Myc als Transkriptionsfaktor ist die Transaktivierung direkter Zielgene. Darüber reguliert Myc eine Vielzahl von essentiellen Prozessen zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase, daher muss dessen Expression und Aktivität strikt kontrolliert werden (s. Abschnitte 1.3 und 1.4). Eine Möglichkeit besteht in der post-translationalen Modifikation von Myc z. B. über die Ubiquitinierung durch Huwe1. Der Prozess der Ubiquitinierung kann verschiedene Auswirkungen auf die jeweiligen Substratproteine haben (Übersicht in (Li & Ye, 2008)). Der am besten charakterisierte Mechanismus besteht in der Modifikation von Proteinen durch K48-verknüpfte Ubiquitinketten, die zumeist den Abbau des Proteins durch das Proteasom zur Folge hat. Verschiedene E3-Ubiquitin-Ligasen können die Ubiquitinierung und Degradierung von Myc induzieren (Übersicht in (Farrell & Sears, 2014)). Während die Stabilität von Myc durch Huwe1 in embryonalen Stammzellen nur in geringem Maße beeinflusst wird (Zhao et al, 2008), konnte in Keratinozyten ein destabilisierender Effekt auf Myc durch Huwe1 nachgewiesen werden (Inoue et al, 2013). Wenn die Inaktivierung von Huwe1 in Kolonkarzinomzelllinien eine Akkumulation des Myc-Proteins zur Folge hätte, widerspräche dies allerdings den Beobachtungen des Proliferationsarrests. Vielmehr kann die Huwe1-vermittelte Ubiquitinierung von Myc die Transaktivierung Myc-gebundener Zielgene induzieren, was auch für die E3-Ligasen Skp2 und Fbxo28 nachgewiesen werden konnte (Adhikary et al, 2005; Cepeda et al, 2013; Kim et al, 2003; von der Lehr et al, 2003). Eine durch Huwe1-Depletion oder den Inhibitoren BI8622 und BI8626 ausgelöste Repression der

Myc-Funktion wäre ein möglicher Mechanismus des beobachteten Proliferationsarrests in Kolonkarzinomzelllinien. Nach sowohl konstitutiver (Abb. 4.4 A, B) als auch induzierbarer (Abb. 4.4 C, D) Depletion von Huwe1 veränderte sich weder die Protein- noch die mRNA-Menge von Myc in Ls174T-Zellen. Dies wurde auch für die Substanzen BI8622 und BI8626 in mehreren Kolonkarzinomzelllinien bestätigt (Abb. 4.13). Damit hat Huwe1 keinen Einfluss auf die Expression von Myc und führt in kolorektalen Karzinomzelllinien auch nicht zu einer Destabilisierung des Proteins. Diese Resultate korrelieren mit der Beobachtung, dass eine Mutante von Myc (MycKR₆), in der sechs Lysine zu Argininen mutiert wurden und die nicht durch Huwe1 ubiquitiniert werden kann, keine veränderte Halbwertszeit aufweist (Adhikary et al, 2005). Zudem ist MycKR₆ nicht in der Lage, direkte Myc-Zielgene zu aktivieren und die Myc-induzierte Transkription von Zielgenen wird in Huwe1-depletierten U2OS-Zellen aufgehoben. Auch in der Kolonkarzinomzelllinie Ls174T führten die Depletion (konstitutiv oder induzierbar) von Huwe1 sowie die Inhibition durch BI8622 und BI8626 zu einer spezifischen Repression von Myc-aktivierten Genen (Abb. 4.4 B, D, „Myc-induziert“; Abb. 4.14 A, C). In beiden Fällen wurde das nicht nur für wenige analysierte Myc-Zielgene, sondern auch genomweit validiert (Abb. 4.5 und Abb. 4.15). Neben der Transaktivierung von Genen kann Myc die Genexpression auch reprimieren, was häufig abhängig ist von Interaktionspartnern wie Miz1 (s. Abschnitt 1.3.2). Überraschenderweise zeigte sich nach Huwe1-Depletion und -Inhibition aber keine Induktion reprimierter Gene (Abb. 4.4 B und Abb. 4.14 A). Ebenso war keine signifikante Anreicherung von durch Huwe1-Inaktivierung regulierten Genen in Myc-reprimierten Gensets zu beobachten (Abb. 4.5, unten und Abb. 4.15 D, unten). Dies lässt darauf schließen, dass Huwe1 zwar für die Transaktivierung von Myc-Zielgenen, aber nicht für die Repression benötigt wird. Dass Aktivierung und Repression der Transkription durch Myc voneinander unabhängige Prozesse sein können, zeigen Experimente mit einer Mutante von Myc: MycV394D ist nicht in der Lage, die Genexpression zu reprimieren, aber die Fähigkeit zur Transaktivierung bleibt weitgehend unbeeinflusst (Walz et al, 2014). Da MycV394D den Interaktionspartner Miz1 nicht binden kann, war dies ein erster Hinweis darauf, dass Miz1 an der Huwe1-vermittelten Regulation der Myc-Transaktivierung beteiligt sein könnte. Diese Regulation kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen: abhängig von der katalytischen Aktivität von Huwe1 oder unabhängig davon z. B. über die Modifikation der Interaktion von Huwe1 mit Miz1 oder Myc. Durch die Depletion von Huwe1 würden beide Mechanismen beeinflusst, während davon ausgegangen werden kann, dass die Huwe1-Inhibitoren die katalytische Aktivität von Huwe1 treffen

(s. Abschnitt 5.3). Der Vergleich der Regulation der Genexpression ergab eine signifikante Korrelation zwischen Depletion und Inhibition von Huwe1, was ein weiterer Beleg für die *in vivo* Spezifität der Huwe1-Inhibitoren ist (Abb. 4.16). Zudem legt das Resultat die Vermutung nahe, dass die katalytische Aktivität von Huwe1 für die Regulation der Myc-vermittelten Transkription verantwortlich ist. Der genaue Mechanismus wird in Abschnitt 5.5 diskutiert.

Ein weiteres interessantes Resultat ist die Induktion des Gens *MUC2* nach Inaktivierung von Huwe1 (Abb. 4.4 B und Abb. 4.14 B). *MUC2* ist ein Differenzierungsmarker in Kolonzellen, dessen Expression von Myc inhibiert wird (van de Wetering et al, 2002). Kolontumorzellen sind durch eine mehr oder weniger starke Dedifferenzierung charakterisiert, wobei der Grad der Differenzierung mit dem Schweregrad des Tumors invers korreliert (Ueno et al, 2012). Die Induktion der Differenzierung stellt einen wichtigen Faktor in der Tumorthherapie dar und die Huwe1-Inhibitoren könnten auf diese Aktivität in weiteren Experimenten genauer analysiert werden.

5.4.3 Die Inaktivierung von Huwe1 reprimiert die Myc-Transaktivierung unabhängig von p53

In Abschnitt 5.4.1 wurde bereits diskutiert, dass die Effekte einer Inaktivierung von Huwe1 wahrscheinlich nicht p53-vermittelt sind. Das tumortherapeutische Potential von Huwe1 in bisherigen Publikationen basierte in verschiedenen Zellsystemen v. a. auf der Stabilisierung von p53 nach der Deletion von Huwe1 (Chen et al, 2005; Hao et al, 2012). In dieser Arbeit konnte allerdings weder nach Depletion noch durch Inhibition von Huwe1 eine Induktion von p53 nachgewiesen werden, was auch mit einem inaktiven Atm/Chk2-Signalweg korrelierte (Abb. 4.6 A, C und Abb. 4.17 A). Zudem hatte die Depletion von p53 keinen Einfluss auf die durch Huwe1-Inaktivierung induzierte Repression der Transkription von Myc-Zielgenen (Abb. 4.6 B und Abb. 4.17 B, C). In mehreren Studien wurden p53-unabhängige Funktionen von Huwe1 in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose beschrieben (Chen et al, 2005; Kurokawa et al, 2013; Qi et al, 2012; Qi et al, 2013). Chen und Kollegen konnten zeigen, dass die Inaktivierung von Huwe1 nicht nur p53-abhängig Apoptose induziert, sondern in p53-defizienten Zellen in einem Zellzyklusarrest resultiert (Chen et al, 2005). Ein wichtiger Regulator dieser Funktionen ist das Protein Arf. Einerseits besitzt Arf p53-abhängige tumorsuppressive Eigenschaften, indem es die E3-Ubiquitin-Ligasen Huwe1 und Mdm2

inhibiert und somit zur Aktivierung von p53 beiträgt (Übersicht in ((Chen et al, 2006)). Andererseits werden weitere tumorsuppressive Merkmale von Arf nicht von p53 vermittelt. Dies wird ersichtlich in p53-negativen Zellen oder Tumoren, in denen Arf einen Proliferationsarrest induzieren kann oder auch in Arf/p53/Mdm2 *triple knockout* Mäusen, die eine höhere Tumorzinzidenz aufweisen als p53/Mdm2 *double knockout* Mäuse (Eymin et al, 2003; Normand et al, 2005; Weber et al, 2000). Es ist bekannt, dass Arf p53-unabhängig die Myc-induzierte Transkription von Zielgenen ähnlich zur analysierten Huwe1-Inaktivierung hemmt und an der Bildung von Myc/Miz1-Komplexen beteiligt ist (Datta et al, 2004; Herkert et al, 2010; Qi et al, 2004). Dies bestätigt das Resultat, dass Huwe1 in den untersuchten Kolonkarzinomzelllinien auch p53-unabhängige Prozesse regulieren kann, indem die E3-Ligase z. B. über die Vermittlung der Aktivität von Arf die Myc-Funktion limitiert. In einer Vielzahl von Tumoren ist p53 deletiert oder inaktiviert. Tumortheraeutische Substanzen (z. B. die Mdm2-Inhibitoren Nutline), deren Wirkung auf der Aktivierung der tumorsuppressiven Eigenschaften von p53 beruht (Übersicht in (Shangary & Wang, 2009)), weisen somit eine eingeschränkte Einsatzmöglichkeit auf. Die Huwe1-Inhibitoren dagegen eröffnen die Möglichkeit, auch unabhängig vom p53-Status der Tumore einen anti-proliferativen Effekt zu erzielen.

5.4.4 Die Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 verzögern den Abbau von N-Myc, haben aber keinen Einfluss auf die Proliferation embryonaler Stammzellen

Bei der Behandlung von Tumorerkrankungen kommt es häufig zu schweren Nebenwirkungen, die durch die Effekte der Chemotherapeutika oder anderer Substanzen auf Nicht-Tumorzellen verursacht werden. Daher besteht das Ziel in der Entwicklung von Substanzen, die spezifisch Tumorzellen angreifen. Die Wirkung der Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 in Kolonkarzinomzelllinien wurde dazu mit den Effekten in murinen embryonalen Stammzellen verglichen. Wenn den Zellen der Wachstumsfaktor LIF entzogen wurde, der für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften nötig ist, verzögerte die Huwe1-Inhibition die dadurch induzierte Abnahme der N-Myc-Proteinmenge (Abb. 4.12 C, D). Dies validiert die Rolle von Huwe1 in der Regulation von N-Myc zur Kontrolle der Differenzierung von embryonalen Stammzellen (Zhao et al, 2008). Weder die Proliferation noch der Anteil toter Zellen wurde durch Huwe1-Inhibition beeinflusst und die Zellen zeigten keinen phänotypischen Unterschied im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 4.12 A, B und

Daten nicht gezeigt). Interessanterweise gibt es auch keine Hinweise darauf, dass embryonale Stammzellen nach Huwe1-Depletion in ihrer Proliferation eingeschränkt sind. Eine potentielle Erklärung dafür ist die gleichzeitige Expression von Myc und N-Myc in embryonalen Stammzellen mit redundanten Funktionen (Übersicht in (Smith & Dalton, 2010)). Ein funktioneller Unterschied zwischen Myc und N-Myc besteht darin, dass N-Myc eine schwächere *in vitro* Interaktion mit Miz1 zeigt und die N-Myc-vermittelte Repression der Genexpression Miz1-unabhängig ist ((Peukert et al, 1997) und Martin Eilers, unveröffentlichte Daten). Die Rolle von Miz1 bei der Huwe1-induzierten Myc-Transaktivierung wird in Abschnitt 5.5 näher diskutiert, doch könnte dies ein Grund für die Huwe1-unabhängige Transaktivierung durch N-Myc sein. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verschiedenen Funktionen von Myc und N-Myc in den jeweiligen Zellen die variablen Effekte einer Inaktivierung von Huwe1 vermitteln. Dadurch kann eine tumorzellspezifische Inhibition von Myc erreicht werden.

5.5 Huwe1 beeinflusst die Aktivität von Myc über die Regulation des Gleichgewichts zwischen aktiven und repressiven Myc/Miz1-Komplexen

Die Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch Ubiquitinierung ist ein weit verbreiteter Prozess, dem verschiedene Mechanismen zu Grunde liegen können (Übersicht in (Hammond-Martel et al, 2012)). Zum einen kann die Lokalisation eines Transkriptionsfaktors durch Ubiquitinierung reguliert werden. Geringe Proteinmengen der E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2 bewirken z. B. die Monoubiquitinierung von p53, was zu einem nukleären Export des Tumorsuppressors führt (Li et al, 2003). In ungestressten Zellen soll darüber die p53-Aktivität limitiert werden. Des Weiteren kann die Assoziation von Transkriptionsfaktoren mit Koaktivatoren oder Korepressoren moduliert werden. Die E3-Ligase SCF^{Met30} oligoubiquitiniert den Transkriptionsfaktor Met4 und hemmt darüber die Interaktion mit einem transkriptionellen Partnerprotein (Kaiser et al, 2000). Zudem überlappt in vielen Transkriptionsfaktoren die Transaktivierungsdomäne (TAD) mit einem Degron, einer Sequenz, die nötig für deren Degradierung ist (Übersicht in (Geng et al, 2012)). In der Hefe *S. cerevisiae* werden transkriptionelle Aktivatoren, welche die VP16-TAD beinhalten, durch SCF^{Met30} ubiquitiniert und proteolytisch abgebaut. Ein Verlust von SCF^{Met30} blockiert nicht nur die Degron-Funktion der VP16-TAD, sondern hemmt auch die Fähigkeit der transkriptionellen Aktivierung (Salghetti et al, 2000). Das resultiert in einem Modell des

licensing, in dem die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren direkt an deren Degradierung gekoppelt ist.

5.5.1 Die Ubiquitinierung von Myc vermittelt nicht ausschließlich die durch Huwe1-Inaktivierung verursachte Repression von Myc-Zielgenen

Auch für Myc wurde beschrieben, dass die E3-Ubiquitin-Ligasen Skp2, Fbxo28 sowie Huwe1 die Myc-Transaktivierung über dessen Ubiquitinierung regulieren (s. Abschnitt 1.5.2) (Adhikary et al, 2005; Cepeda et al, 2013; Kim et al, 2003; von der Lehr et al, 2003). Die Huwe1-induzierte Ubiquitinierung von Myc führt, wie oben beschrieben, zu einer Modifikation der Interaktion mit einem Koaktivator, nämlich zur Rekrutierung der Histonacetyltransferase p300, die zu einer aktiven Transkription beiträgt (Adhikary et al, 2005). Die Schlussfolgerung, dass die Ubiquitinierung von Myc dazu nötig ist, beruht auf Experimenten mit der MycKR₆-Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, p300 an Zielpromotoren zu rekrutieren. Da dies nicht mit einer Inaktivierung von Huwe1 untersucht wurde, ist nicht auszuschließen, dass zusätzlich von der Myc-Ubiquitinierung unabhängige Huwe1-Funktionen an der Regulation der Transaktivierung beteiligt sind. So zeigte die Inhibition von Huwe1 durch BI8622 und BI8626 weder eine Änderung in der Interaktion zwischen Myc und Huwe1 noch in der Huwe1-induzierten Ubiquitinierung von Myc (Abb. 4.18). Ob die Rekrutierung von p300 an Zielpromotoren von Myc trotzdem dadurch beeinflusst wird, müssten zusätzliche ChIP-Experimente klären. Es lässt aber darauf schließen, dass nach der Inaktivierung von Huwe1 weitere Mechanismen, die nicht durch die Ubiquitinierung von Myc vermittelt werden, zur Repression der Myc-induzierten Transkription beitragen.

5.5.2 Die Inaktivierung von Huwe1 führt nicht zur Akkumulation von Hdac2

Huwe1 vermittelt die Ubiquitinierung einer Vielzahl weiterer Proteine (s. Abschnitt 1.5.4), von denen mehrere an der Regulation der Transkription beteiligt sein können. Die Histondeacetylase Hdac2 wird durch Huwe1 ubiquitiniert und daraufhin degradiert (Zhang et al, 2011a). Zum einen kann Hdac2 über die Deacetylierung von Histonen zu einer geschlosseneren Chromatinstruktur und damit zur Repression der Transkription beitragen

(Heinzel et al, 1997; Laherty et al, 1997). Zum anderen belegen verschiedene Publikationen, dass Hdac2 zusammen mit mSin3A als Korepressorkomplex mit repressiven Mxd/Max-Komplexen assoziiert ist (Billin et al, 1999; Laherty et al, 1997). Die Familie der Mxd-Proteine gehört ebenfalls zu den bHLH-LZ Transkriptionsfaktoren, die anstelle von Myc mit Max interagieren können und die Myc-Transaktivierung an E-Boxen antagonisieren (Übersicht in (Conacci-Sorrell et al, 2014)). Eine Akkumulation von Hdac2 nach Inaktivierung von Huwe1 könnte über einen repressiven Mxd/Max-Komplex die Myc-vermittelte Genexpression einschränken. Allerdings hatten weder Inhibition noch Depletion von Huwe1 einen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge von Hdac2 (Abb. 4.19). Damit kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Huwe1 für die lokale Degradierung von Hdac2 an Mxd/Max-gebundenen oder Myc/Max-gebundenen E-Box-Promotoren benötigt wird und darüber die Transaktivierung von Myc-Zielgenen begünstigt.

5.5.3 Die Huwe1-Inhibitoren BI8622 und BI8626 induzieren die Bildung eines repressiven Myc/Miz1-Komplexes am Myc-aktivierten Zielgen *HSPE1*

Eines der wichtigsten Partnerproteine in der Myc-regulierten Transkription ist Miz1 (s. Abschnitt 1.3.2). Bisherige Daten belegen, dass die Interaktion zwischen Myc und Miz1 in einem repressiven Komplex resultiert, durch den die Transkription verschiedener Miz1-Zielgene gehemmt wird (Übersicht in (Wiese et al, 2013)). Neuere Studien modifizieren dieses Modell, da mittlerweile verschiedene Gruppen von Genen identifiziert wurden, die eine differentielle Regulation durch Myc/Miz1 aufweisen. Zum einen gibt es eine Reihe von Genen, die sowohl Myc als auch Miz1 gebunden haben und die Ko-Besetzung korreliert mit der Bindung von RNA-Polymerase II sowie einer offenen Chromatinstruktur (Walz et al, 2014). Zum anderen ist Myc in der Lage, Miz1 an E-Box-Promotoren zu rekrutieren. Sowohl Myc als auch Miz1 kann die Transkription aktivieren, beide Proteine weisen im Komplex aber repressive Funktionen auf. Dies resultiert in einem Modell, in dem das Verhältnis von Myc/Miz1 an den jeweiligen Promotoren die Aktivierung oder Repression der Transkription bestimmt. Dahingehend zeigen Myc-induzierte Gene ein hohes Myc/Miz1-Verhältnis, während es an Myc-reprimierten Genen abnimmt. Es kann vermutet werden, dass das Verhältnis von Myc/Miz1 an Promotoren durch unterschiedliche Protein-Protein-Interaktionen bestimmt wird. Huwe1 interagiert mit beiden Proteinen (Adhikary et al, 2005) und induziert zudem die Ubiquitinierung und Degradierung von Miz1 (Inoue et al, 2013;

Yang et al, 2010). Die Inaktivierung von Huwe1 durch Depletion oder die Inhibitoren BI8622 und BI8626 führte zu einer Zunahme der Gesamtproteinmenge an Miz1 (Abb. 4.19). Dies wiederum korrelierte mit einer vermehrten Rekrutierung von Miz1 am Myc-aktivierten E-Box-Zielgen *HSPE1* (Abb. 4.20). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Huwe1 ein möglicher Regulator des Myc/Miz1-Verhältnisses an Promotoren ist und die Inaktivierung zu der Bildung von repressiven Myc/Miz1-Komplexen führt. Wie in Abschnitt 5.5.1 diskutiert, kann dies zum Teil von der Huwe1-vermittelten Myc-Ubiquitinierung abhängen, da sich die Ubiquitinierung von Myc und die Interaktion mit Miz1 gegenseitig ausschließen (Adhikary et al, 2005). Somit würde Huwe1 über die Myc-Ubiquitinierung die Bildung repressiver Myc/Miz1-Komplexe verhindern. Ein weiterer Beleg für diesen Mechanismus ist die Punktmutante MycV394D (s. Abschnitt 5.4.2). In diesem Bereich um die Aminosäure 394 liegen mehrere Lysine, die ubiquitiniert werden können (Kim et al, 2011), was durch die fehlende Miz1-Bindung begünstigt werden und damit zur Transaktivierung beitragen könnte. Zur Validierung müssten allerdings die Lysine identifiziert werden, die von Huwe1 modifiziert werden. Ein zweiter möglicher Mechanismus der Huwe1-regulierten Myc-Transaktivierung besteht, wie hier analysiert, in der Degradierung von Miz1. Eine veränderte DNA-Bindung von Myc trägt wahrscheinlich nicht zu diesem Mechanismus bei, da keine für beide Huwe1-Inhibitoren konsistente Zu- oder Abnahme der Myc-Bindung an den untersuchten Promotoren beobachtet wurde und auch die Depletion von Huwe1 darauf keinen Einfluss hatte (Abb. 4.21 A und Abb. 4.22). Allerdings korrelierte die Bildung eines repressiven Myc/Miz1-Komplexes mit einer verminderten Acetylierung von Histon H3 und teilweise auch Histon H4 nach Inaktivierung von Huwe1 (Abb. 4.21 B und Abb. 4.22). Es kann spekuliert werden, inwieweit Histon-modifizierende Proteine daran beteiligt sind. Möglich wäre eine verstärkte Deacetylierung durch Hdac2, das nach Huwe1-Inaktivierung an Promotoren akkumulieren könnte (s. Abschnitt 5.5.2). Des Weiteren kann auch die Rekrutierung von Koaktivatorkomplexen mit HAT-Aktivität, z. B. des Myc-interagierenden STAGA-Trrap-Gcn5-Komplexes, beeinflusst sein, was durch weitere ChIP-Experimente genauer untersucht werden könnte.

Die Formation eines repressiven Myc/Miz1-Komplexes ist konsistent mit den Beobachtungen in einem Mausmodell der Hautkarzinogenese. Die Deletion von Huwe1 führt in diesem System ebenfalls zu einem stabilisierten Myc/Miz1-Komplex, was mit einer verstärkten Repression der Miz1-Zielgene *Cdkn1a* (p21Cip1) und *Cdkn2b* (p15Ink4b) einhergeht und das Tumorstadium begünstigt (Inoue et al, 2013). Auch in primären Keratinozyten führte die

Inaktivierung von Huwe1 durch Inhibition oder Depletion zu einer Zunahme der Miz1- und Myc-Proteinmengen (Daten nicht gezeigt). Wie anfangs diskutiert, stellt sich dabei die Frage, weshalb Huwe1 in verschiedenen Systemen tumorsuppressive oder onkogene Eigenschaften aufweist. Interessanterweise führt die Deletion von *Myc* oder *Miz1* in der *Ras*-induzierten Hauttumorgenese zu einer Induktion von *Cdkn1a* und hemmt darüber die Tumorbildung, während die Ko-Deletion von *Cdkn1a* dies revertiert (Honnemann et al, 2012; Oskarsson et al, 2006). Während in Kolonkarzinomzellen die Myc-vermittelte Transaktivierung essentiell für die Tumorgenese zu sein scheint, ist die Myc-vermittelte Repression von Zielgenen in diesem Tumorsystem höchstwahrscheinlich notwendig. Daher kann auch die durch Inaktivierung von Huwe1 induzierte Akkumulation von Miz1 unterschiedliche Auswirkungen zeigen.

5.5.4 Die Inaktivierung von Huwe1 führt zur Akkumulation von Miz1 am direkten Miz1-Zielgen *VAMP4*, reguliert aber nicht die Expression

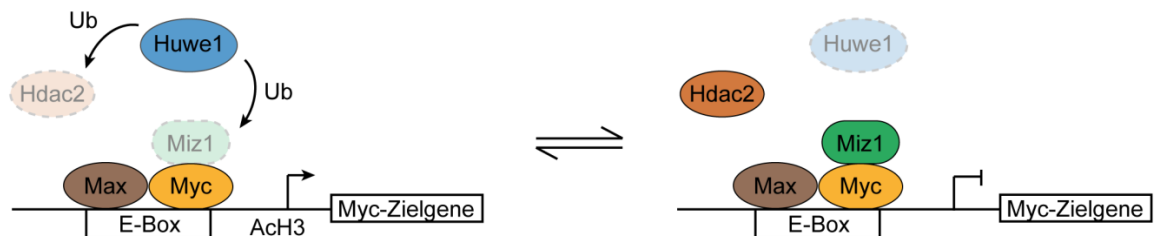
Im vorigen Abschnitt wurde die Rolle von Miz1 und Huwe1 bei der Regulation von Myc-aktivierten E-Box-Zielgenen diskutiert. Vor kurzem wurde eine Gruppe von Genen identifiziert, die ein spezifisches Bindemotiv für Miz1 an Zielpromotoren aufweisen und direkt durch Miz1 reguliert werden sowie eine sehr schwache Myc-Bindung zeigen (Walz et al, 2014; Wolf et al, 2013). Eines dieser Gene ist *VAMP4*, an dessen Promoter sich nach Huwe1-Inhibition ebenfalls eine signifikante Akkumulation von Miz1 zeigte, während die Myc-Bindung verringert wurde (Abb. 4.20 und Abb. 4.21 A). Wie eingangs erwähnt, weisen die direkten Miz1-Zielpromotoren an sich eine sehr niedrige Affinität für Myc auf. Daher kann vermutet werden, dass schwach gebundenes Myc durch die starke Zunahme von Miz1 nach Huwe1-Inaktivierung teilweise vom Promoter verdrängt wird. Funktionell hat dies wahrscheinlich keine Auswirkungen, da Myc bei diesen Genen nicht zur Regulation beiträgt (Walz et al, 2014). Im Unterschied zum Myc-aktivierten Gen *HSPE1* konnte am *VAMP4*-Promoter keine für beide Huwe1-Inhibitoren konsistente Deacetylierung von Histonen beobachtet werden (Abb. 4.21 B). Wie in Abb. 4.23 gezeigt werden konnte, hatte die Inhibition von Huwe1 weder einen Einfluss auf die Expression von *VAMP4* noch allgemein auf direkte Miz1-gebundene Zielgene. Dies lässt vermuten, dass die durch die Substanz BI8626 verringerte Acetylierung von Histon H3 keine physiologischen Effekte auf die Transkription hat. Miz1 bindet an seine direkten Zielgene mit hoher Affinität und induziert

dabei deren Expression (Walz et al, 2014). Somit sind diese Promotoren vermutlich abgesättigt und eine verstärkte Miz1-Rerutierung durch Inaktivierung von Huwe1 führt weder zu einer Repression noch zu einer verstärkten Aktivierung der Gene.

5.5.5 Modell der Huwe1-regulierten Transaktivierung von Myc-Zielgenen

Zusammengefasst resultierten die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente in einem erweiterten Modell der Regulation der Myc-Transaktivierung durch Huwe1. Die Inaktivierung von Huwe1 führt über die Akkumulation von Miz1 zu einem verringertem Myc/Miz1-Verhältnis, wodurch das Equilibrium von Myc/Miz1-Komplexen an E-Box-Promotoren von aktivierenden zu repressiven Komplexen verschoben wird (Abb. 5.2 A). An direkten Miz1-Zielgenen, die Miz1 an sich stark gebunden haben, hat dies dagegen keine Auswirkung auf die Transkription (Abb. 5.2 B).

A



B

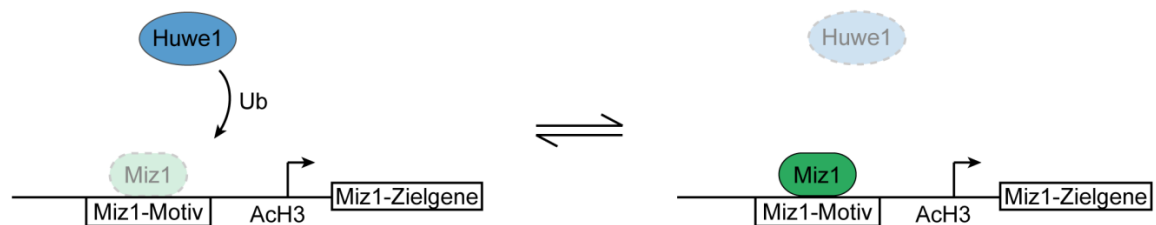


Abb. 5.2 Huwe1 reguliert das Gleichgewicht zwischen aktiven und repressiven Myc/Miz1-Komplexen

(A) Huwe1 wird in Kolonkarzinomzellen zur kontinuierlichen Degradierung von Miz1 an Myc-aktivierten Zielgenen benötigt. Die Inaktivierung von Huwe1 führt zur Akkumulation von Miz1 und zur Bildung eines repressiven Myc/Miz1-Komplexes an den E-Box-Zielgenen. Dies korreliert mit einer verminderten Histonacetylierung und einer Repression der Genexpression. Weitere Mechanismen, wie die lokale Stabilisierung von Hdac2, können dazu beitragen.

(B) Miz1 bindet mit hoher Affinität an direkte Miz1-Zielgene, aktiviert deren Transkription und kann durch Huwe1 ubiquitiniert werden. Nach Huwe1-Inaktivierung akkumuliert Miz1 an diesen Genen. Da die Promotoren durch Miz1 abgesättigt sind, beeinflusst dies weder die Histonacetylierung noch die Expression.

Damit ist eine spezifische Inhibition der Myc-aktivierten Genexpression möglich. Mehrere Faktoren tragen zudem zur Spezifität dieses Mechanismus in Kolonkarzinomzellen bei. Zum einen ist die Transaktivierungsfunktion von Myc im Kolonkarzinom essentiell, während in anderen Tumormodellen die Repression durch Myc diese Aufgabe übernimmt (s. Abschnitt 5.5.3). Zum anderen ist Hdac2 durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs im Kolonkarzinom überexprimiert (Zhu et al, 2004). Wie in Abschnitt 5.5.2 diskutiert, kann eine mögliche Stabilisierung von Hdac2 an Myc-aktivierten Promotoren nach Huwe1-Inaktivierung zur Histondeacetylierung und damit zur Repression beitragen. Überdies finden sich in Tumorzellen erhöhte Proteinmengen von Arf, das die Transaktivierung durch Myc hemmt (s. Abschnitt 5.4.3). Beide Proteine können somit das therapeutische Potential der Huwe1-Inhibitoren verstärken. Des Weiteren sind z. B. embryonale Stammzellen eher abhängig von N-Myc, welches vorrangig Miz1-unabhängige Funktionen erfüllt und somit werden diese Zellen von einer Huwe1-Inhibition nicht beeinflusst (s. Abschnitt 5.4.4). All diese Prozesse machen eine tumorzellspezifische Hemmung der Myc-Funktion durch Inhibition von Huwe1 über niedermolekulare Substanzen möglich.

6 Literaturverzeichnis

Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S et al (2005) The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 123: 409-421

Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA (2013) Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2: e71

Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T (2006) let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 29: 903-906

Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H (1993) Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72: 233-245

Arabi A, Wu S, Ridderstrale K, Bierhoff H, Shiue C, Fatyol K, Fahlen S, Hydbring P, Soderberg O, Grummt I et al (2005) c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nature cell biology* 7: 303-310

Aravind L (2001) The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends in biochemical sciences* 26: 273-275

Arvanitis C, Felsher DW (2006) Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis. *Seminars in cancer biology* 16: 313-317

Bahram F, von der Lehr N, Cetinkaya C, Larsson LG (2000) c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood* 95: 2104-2110

Bello-Fernandez C, Packham G, Cleveland JL (1993) The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7804-7808

Berg T, Cohen SB, Desharnais J, Sonderegger C, Maslyar DJ, Goldberg J, Boger DL, Vogt PK (2002) Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 3830-3835

Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G (2008) The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer cell* 14: 10-21

Billin AN, Eilers AL, Queva C, Ayer DE (1999) Mlx, a novel Max-like BHLHZip protein that interacts with the Max network of transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 274: 36344-36350

Blackwell TK, Huang J, Ma A, Kretzner L, Alt FW, Eisenman RN, Weintraub H (1993) Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Molecular and cellular biology* 13: 5216-5224

Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H (1990) Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250: 1149-1151

Blackwood EM, Eisenman RN (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251: 1211-1217

Blackwood EM, Luscher B, Eisenman RN (1992) Myc and Max associate in vivo. *Genes & development* 6: 71-80

Bouchard C, Dittrich O, Kiermaier A, Dohmann K, Menkel A, Eilers M, Luscher B (2001) Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes & development* 15: 2042-2047

Bouchard C, Marquardt J, Bras A, Medema RH, Eilers M (2004) Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *The EMBO journal* 23: 2830-2840

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254

Brenner C, Deplus R, Didelot C, Loriot A, Vire E, De Smet C, Gutierrez A, Danovi D, Bernard D, Boon T et al (2005) Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *The EMBO journal* 24: 336-346

Brewer G, Ross J (1988) Poly(A) shortening and degradation of the 3' A+U-rich sequences of human c-myc mRNA in a cell-free system. *Molecular and cellular biology* 8: 1697-1708

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224: 1121-1124

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553

Cancer Genome Atlas N (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487: 330-337

Cannell IG, Kong YW, Johnston SJ, Chen ML, Collins HM, Dobbyn HC, Elia A, Kress TR, Dickens M, Clemens MJ et al (2010) p38 MAPK/MK2-mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 5375-5380

Cepeda D, Ng HF, Sharifi HR, Mahmoudi S, Cerrato VS, Fredlund E, Magnusson K, Nilsson H, Malyukova A, Rantala J et al (2013) CDK-mediated activation of the SCF(FBXO) (28) ubiquitin ligase promotes MYC-driven transcription and tumourigenesis and predicts poor survival in breast cancer. *EMBO molecular medicine* 5: 999-1018

Chan CH, Morrow JK, Li CF, Gao Y, Jin G, Moten A, Stagg LJ, Ladbury JE, Cai Z, Xu D et al (2013) Pharmacological inactivation of Skp2 SCF ubiquitin ligase restricts cancer stem cell traits and cancer progression. *Cell* 154: 556-568

Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massague J (2002) E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* 110: 19-32

Chen D, Brooks CL, Gu W (2006) ARF-BP1 as a potential therapeutic target. *British journal of cancer* 94: 1555-1558

Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W (2005) ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121: 1071-1083

Choi SH, Wright JB, Gerber SA, Cole MD (2010) Myc protein is stabilized by suppression of a novel E3 ligase complex in cancer cells. *Genes & development* 24: 1236-1241

Ciechanover A (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *The EMBO journal* 17: 7151-7160

Ciechanover A, Ben-Saadon R (2004) N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends in cell biology* 14: 103-106

Clausen DM, Guo J, Parise RA, Beumer JH, Egorin MJ, Lazo JS, Prochownik EV, Eisenman JL (2010) In vitro cytotoxicity and in vivo efficacy, pharmacokinetics, and metabolism of 10074-G5, a novel small-molecule inhibitor of c-Myc/Max dimerization. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 335: 715-727

Conacci-Sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN (2014) An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4: a014357

Confalonieri S, Quarto M, Goisis G, Nuciforo P, Donzelli M, Jodice G, Pelosi G, Viale G, Pece S, Di Fiore PP (2009) Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor. *Oncogene* 28: 2959-2968

Cowling VH, Chandriani S, Whitfield ML, Cole MD (2006) A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Molecular and cellular biology* 26: 4226-4239

D'Arca D, Zhao X, Xu W, Ramirez-Martinez NC, Iavarone A, Lasorella A (2010) Huwe1 ubiquitin ligase is essential to synchronize neuronal and glial differentiation in the developing cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 5875-5880

Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982) Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 7824-7827

Dang CV, Lee WM (1988) Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Molecular and cellular biology* 8: 4048-4054

Dani C, Blanchard JM, Piechaczyk M, El Sabouty S, Marty L, Jeanteur P (1984) Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 7046-7050

Datta A, Nag A, Pan W, Hay N, Gartel AL, Colamonici O, Mori Y, Raychaudhuri P (2004) Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc. *The Journal of biological chemistry* 279: 36698-36707

Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, Masuo Y, Agrawal G (2007) Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current genomics* 8: 234-251

Delacroix S, Wagner JM, Kobayashi M, Yamamoto K, Karnitz LM (2007) The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes & development* 21: 1472-1477

Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, Kastiris E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J et al (2011) BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 146: 904-917

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O et al (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in

culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 9363-9367

Eberhardy SR, D'Cunha CA, Farnham PJ (2000) Direct examination of histone acetylation on Myc target genes using chromatin immunoprecipitation. *The Journal of biological chemistry* 275: 33798-33805

Eberhardy SR, Farnham PJ (2001) c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *The Journal of biological chemistry* 276: 48562-48571

Efeyan A, Serrano M (2007) p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell cycle* 6: 1006-1010

Endo S, Yamato K, Hirai S, Moriwaki T, Fukuda K, Suzuki H, Abei M, Nakagawa I, Hyodo I (2011) Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells. *Cancer science* 102: 605-613

Eymin B, Leduc C, Coll JL, Brambilla E, Gazzeri S (2003) p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. *Oncogene* 22: 1822-1835

Fan YH, Cheng J, Vasudevan SA, Dou J, Zhang H, Patel RH, Ma IT, Rojas Y, Zhao Y, Yu Y et al (2013) USP7 inhibitor P22077 inhibits neuroblastoma growth via inducing p53-mediated apoptosis. *Cell death & disease* 4: e867

Farrell AS, Sears RC (2014) MYC Degradation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4

Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes & development* 17: 1115-1129

Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, Amati B (2003) MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO reports* 4: 575-580

Fujii T, Kawahara A, Basaki Y, Hattori S, Nakashima K, Nakano K, Shirouzu K, Kohno K, Yanagawa T, Yamana H et al (2008) Expression of HER2 and estrogen receptor alpha depends upon nuclear localization of Y-box binding protein-1 in human breast cancers. *Cancer research* 68: 1504-1512

Gartel AL, Ye X, Goufman E, Shianov P, Hay N, Najmabadi F, Tyner AL (2001) Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4510-4515

Geng F, Wenzel S, Tansey WP (2012) Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annual review of biochemistry* 81: 177-201

Gomez-Curet I, Perkins RS, Bennett R, Feidler KL, Dunn SP, Krueger LJ (2006) c-Myc inhibition negatively impacts lymphoma growth. *Journal of pediatric surgery* 41: 207-211; discussion 207-211

Gomez-Roman N, Grandori C, Eisenman RN, White RJ (2003) Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 421: 290-294

Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, White RJ (2005) c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nature cell biology* 7: 311-318

Gregory MA, Hann SR (2000) c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Molecular and cellular biology* 20: 2423-2435

Guccione E, Martinato F, Finocchiaro G, Luzi L, Tizzoni L, Dall' Olio V, Zardo G, Nervi C, Bernard L, Amati B (2006) Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nature cell biology* 8: 764-770

Guo J, Parise RA, Joseph E, Egorin MJ, Lazo JS, Prochownik EV, Eiseman JL (2009) Efficacy, pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of the Myc-Max disruptor, 10058-F4 [Z,E]-5-[4-ethylbenzylidene]-2-thioxothiazolidin-4-one, in mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 63: 615-625

Gupta S, Seth A, Davis RJ (1993) Transactivation of gene expression by Myc is inhibited by mutation at the phosphorylation sites Thr-58 and Ser-62. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 3216-3220

Hall JR, Kow E, Nevis KR, Lu CK, Luce KS, Zhong Q, Cook JG (2007) Cdc6 stability is regulated by the Huwe1 ubiquitin ligase after DNA damage. *Molecular biology of the cell* 18: 3340-3350

Hammond-Martel I, Yu H, Affar el B (2012) Roles of ubiquitin signaling in transcription regulation. *Cellular signalling* 24: 410-421

Hao Z, Duncan GS, Su YW, Li WY, Silvester J, Hong C, You H, Brenner D, Gorrini C, Haight J et al (2012) The E3 ubiquitin ligase Mule acts through the ATM-p53 axis to maintain B lymphocyte homeostasis. *The Journal of experimental medicine* 209: 173-186

Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI (2001) U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *The Journal of biological chemistry* 276: 33111-33120

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512

Heinzel T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie JR et al (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387: 43-48

Hemann MT, Bric A, Teruya-Feldstein J, Herbst A, Nilsson JA, Cordon-Cardo C, Cleveland JL, Tansey WP, Lowe SW (2005) Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436: 807-811

Henriksson M, Bakardjiev A, Klein G, Luscher B (1993) Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential. *Oncogene* 8: 3199-3209

Herbst A, Hemann MT, Tworkowski KA, Salghetti SE, Lowe SW, Tansey WP (2005) A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO reports* 6: 177-183

Herkert B, Dwertmann A, Herold S, Abed M, Naud JF, Finkernagel F, Harms GS, Orian A, Wanzel M, Eilers M (2010) The Arf tumor suppressor protein inhibits Miz1 to suppress cell adhesion and induce apoptosis. *The Journal of cell biology* 188: 905-918

Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell BC, Mateyak MK, Tam W, Kohlhuber F et al (2000) Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 2229-2234

Herold S, Hock A, Herkert B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen R, Bernards R, Eilers M (2008) Miz1 and HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1. *The EMBO journal* 27: 2851-2861

Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaioja J, Saluz HP, Haenel F, Eilers M (2002) Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Molecular cell* 10: 509-521

Hoeller D, Dikic I (2009) Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 458: 438-444

Holien T, Vatsveen TK, Hella H, Waage A, Sundan A (2012) Addiction to c-MYC in multiple myeloma. *Blood* 120: 2450-2453

Honnemann J, Sanz-Moreno A, Wolf E, Eilers M, Elsassner HP (2012) Miz1 is a critical repressor of cdkn1a during skin tumorigenesis. *PloS one* 7: e34885

Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, Huibregtse JM, Pavletich NP (1999) Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* 286: 1321-1326

Huang MJ, Cheng YC, Liu CR, Lin S, Liu HE (2006) A small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, induces cell-cycle arrest, apoptosis, and myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia. *Experimental hematology* 34: 1480-1489

Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 2563-2567

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO journal* 10: 4129-4135

Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF (1997) Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 10330-10334

Inoue S, Hao Z, Elia AJ, Cescon D, Zhou L, Silvester J, Snow B, Harris IS, Sasaki M, Li WY et al (2013) Mule/Huwei1/Arf-BP1 suppresses Ras-driven tumorigenesis by preventing c-Myc/Miz1-mediated down-regulation of p21 and p15. *Genes & development* 27: 1101-1114

Izumi H, Molander C, Penn LZ, Ishisaki A, Kohno K, Funa K (2001) Mechanism for the transcriptional repression by c-Myc on PDGF beta-receptor. *Journal of cell science* 114: 1533-1544

Jakobovits A, Schwab M, Bishop JM, Martin GR (1985) Expression of N-myc in teratocarcinoma stem cells and mouse embryos. *Nature* 318: 188-191

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61: 69-90

Kaiser P, Flick K, Wittenberg C, Reed SI (2000) Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* 102: 303-314

Kanazawa S, Soucek L, Evan G, Okamoto T, Peterlin BM (2003) c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene* 22: 5707-5711

Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R (2003) Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *The oncologist* 8: 508-513

Kc W, Satpathy AT, Rapaport AS, Briseno CG, Wu X, Albring JC, Russler-Germain EV, Kretzer NM, Durai V, Persaud SP et al (2014) L-Myc expression by dendritic cells is required for optimal T-cell priming. *Nature*

Khoronenkova SV, Dianov GL (2013) USP7S-dependent inactivation of Mule regulates DNA damage signalling and repair. *Nucleic acids research* 41: 1750-1756

Kim SY, Herbst A, Tworkowski KA, Salghetti SE, Tansey WP (2003) Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Molecular cell* 11: 1177-1188

Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, Possemato A, Sowa ME, Rad R, Rush J, Comb MJ et al (2011) Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular cell* 44: 325-340

Kinsella TM, Nolan GP (1996) Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Human gene therapy* 7: 1405-1413

Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 820-823

Kobayashi S, Shimamura T, Monti S, Steidl U, Hetherington CJ, Lowell AM, Golub T, Meyerson M, Tenen DG, Shapiro GI et al (2006) Transcriptional profiling identifies cyclin D1 as a critical downstream effector of mutant epidermal growth factor receptor signaling. *Cancer research* 66: 11389-11398

Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, Alt FW (1983) Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35: 359-367

Kon N, Zhong J, Qiang L, Accili D, Gu W (2012) Inactivation of arf-bp1 induces p53 activation and diabetic phenotypes in mice. *The Journal of biological chemistry* 287: 5102-5111

Kramer OH (2009) HDAC2: a critical factor in health and disease. *Trends in pharmacological sciences* 30: 647-655

Kress TR, Cannell IG, Brenkman AB, Samans B, Gaestel M, Roepman P, Burgering BM, Bushell M, Rosenwald A, Eilers M (2011) The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis. *Molecular cell* 41: 445-457

Kumagai A, Lee J, Yoo HY, Dunphy WG (2006) TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124: 943-955

Kurland JF, Tansey WP (2008) Myc-mediated transcriptional repression by recruitment of histone deacetylase. *Cancer research* 68: 3624-3629

Kurokawa M, Kim J, Geradts J, Matsuura K, Liu L, Ran X, Xia W, Ribar TJ, Henao R, Dewhirst MW et al (2013) A Network of Substrates of the E3 Ubiquitin Ligases MDM2 and HUWE1 Control Apoptosis Independently of p53. *Science signaling* 6: ra32

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E, Eisenman RN (1997) Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89: 349-356

Leboucher GP, Tsai YC, Yang M, Shaw KC, Zhou M, Veenstra TD, Glickman MH, Weissman AM (2012) Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Molecular cell* 47: 547-557

Levens D (2010) You Don't Muck with MYC. *Genes & cancer* 1: 547-554

Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W (2003) Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302: 1972-1975

Li W, Ye Y (2008) Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 65: 2397-2406

Lin CP, Liu JD, Chow JM, Liu CR, Liu HE (2007) Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Anti-cancer drugs* 18: 161-170

Lin CY, Loven J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA (2012) Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 151: 56-67

Liu Z, Oughtred R, Wing SS (2005) Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones. *Molecular and cellular biology* 25: 2819-2831

Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 11364-11369

Lutterbach B, Hann SR (1994) Hierarchical phosphorylation at N-terminal transformation-sensitive sites in c-Myc protein is regulated by mitogens and in mitosis. *Molecular and cellular biology* 14: 5510-5522

Marshall NF, Price DH (1992) Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Molecular and cellular biology* 12: 2078-2090

McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD (1998) The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94: 363-374

McMahon SB, Wood MA, Cole MD (2000) The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Molecular and cellular biology* 20: 556-562

Menssen A, Hermeking H (2002) Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 6274-6279

Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, Sandy P, Balasubramanian S, Mele DA, Bergeron L, Sims RJ, 3rd (2011) Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 16669-16674

Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM (2012) HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of cell science* 125: 531-537

Meyer N, Penn LZ (2008) Reflecting on 25 years with MYC. *Nature reviews Cancer* 8: 976-990

Micel LN, Tentler JJ, Smith PG, Eckhardt GS (2013) Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies. *Journal of clinical oncology* : official journal of the American Society of Clinical Oncology 31: 1231-1238

Miltenberger RJ, Sukow KA, Farnham PJ (1995) An E-box-mediated increase in cad transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants. *Molecular and cellular biology* 15: 2527-2535

- Mueller TD, Feigon J (2002) Solution structures of UBA domains reveal a conserved hydrophobic surface for protein-protein interactions. *Journal of molecular biology* 319: 1243-1255
- Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-267
- Nau MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, McBride OW, Bertness V, Hollis GF, Minna JD (1985) L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 318: 69-73
- Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, Resch W, Wang R, Green DR, Tessarollo L, Casellas R et al (2012) c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* 151: 68-79
- Normand G, Hemmati PG, Verdoodt B, von Haefen C, Wendt J, Guner D, May E, Dorken B, Daniel PT (2005) p14ARF induces G2 cell cycle arrest in p53- and p21-deficient cells by down-regulating p34cdc2 kinase activity. *The Journal of biological chemistry* 280: 7118-7130
- Noy T, Suad O, Taglicht D, Ciechanover A (2012) HUWE1 ubiquitinates MyoD and targets it for proteasomal degradation. *Biochemical and biophysical research communications* 418: 408-413
- Oskarsson T, Essers MA, Dubois N, Offner S, Dubey C, Roger C, Metzger D, Chambon P, Hummler E, Beard P et al (2006) Skin epidermis lacking the c-Myc gene is resistant to Ras-driven tumorigenesis but can reacquire sensitivity upon additional loss of the p21Cip1 gene. *Genes & development* 20: 2024-2029
- Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV (2000) Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *The Journal of biological chemistry* 275: 21797-21800
- Ott CJ, Kopp N, Bird L, Paranal RM, Qi J, Bowman T, Rodig SJ, Kung AL, Bradner JE, Weinstock DM (2012) BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120: 2843-2852
- Pandya RK, Partridge JR, Love KR, Schwartz TU, Ploegh HL (2010) A structural element within the HUWE1 HECT domain modulates self-ubiquitination and substrate ubiquitination activities. *The Journal of biological chemistry* 285: 5664-5673
- Parsons JL, Tait PS, Finch D, Dianova II, Edelmann MJ, Khoronenkova SV, Kessler BM, Sharma RA, McKenna WG, Dianov GL (2009) Ubiquitin ligase ARF-BP1/Mule modulates base excision repair. *The EMBO journal* 28: 3207-3215

- Patel JH, Du Y, Ard PG, Phillips C, Carella B, Chen CJ, Rakowski C, Chatterjee C, Lieberman PM, Lane WS et al (2004) The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Molecular and cellular biology* 24: 10826-10834
- Paul I, Ahmed SF, Bhowmik A, Deb S, Ghosh MK (2013) The ubiquitin ligase CHIP regulates c-Myc stability and transcriptional activity. *Oncogene* 32: 1284-1295
- Pesce M, Scholer HR (2001) Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem cells* 19: 271-278
- Peukert K, Staller P, Schneider A, Carmichael G, Hanel F, Eilers M (1997) An alternative pathway for gene regulation by Myc. *The EMBO journal* 16: 5672-5686
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry* 70: 503-533
- Popov N, Schulein C, Jaenicke LA, Eilers M (2010) Ubiquitylation of the amino terminus of Myc by SCF(beta-TrCP) antagonizes SCF(Fbw7)-mediated turnover. *Nature cell biology* 12: 973-981
- Prendergast GC, Ziff EB (1991) Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 251: 186-189
- Qi CF, Kim YS, Xiang S, Abdullaev Z, Torrey TA, Janz S, Kovalchuk AL, Sun J, Chen D, Cho WC et al (2012) Characterization of ARF-BP1/HUWE1 Interactions with CTCF, MYC, ARF and p53 in MYC-Driven B Cell Neoplasms. *International journal of molecular sciences* 13: 6204-6219
- Qi CF, Zhang R, Sun J, Li Z, Shin DM, Wang H, Kovalchuk AL, Sakai T, Xiong H, Kon N et al (2013) Homeostatic defects in B cells deficient in the E3 ubiquitin ligase ARF-BP1 are restored by enhanced expression of MYC. *Leukemia research* 37: 1680-1689
- Qi Y, Gregory MA, Li Z, Brousal JP, West K, Hann SR (2004) p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. *Nature* 431: 712-717
- Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, Sharp PA, Young RA (2010) c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 141: 432-445
- Rahl PB, Young RA (2014) MYC and transcription elongation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4: a020990
- Reverdy C, Conrath S, Lopez R, Planquette C, Atmanene C, Collura V, Harpon J, Battaglia V, Vivat V, Sippl W et al (2012) Discovery of specific inhibitors of human USP7/HAUSP deubiquitinating enzyme. *Chemistry & biology* 19: 467-477

Roh JL, Kang SK, Minn I, Califano JA, Sidransky D, Koch WM (2011) p53-Reactivating small molecules induce apoptosis and enhance chemotherapeutic cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 47: 8-15

Rohwedel J, Guan K, Wobus AM (1999) Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells, tissues, organs* 165: 190-202

Roussel MF, Davis JN, Cleveland JL, Ghysdael J, Hiebert SW (1994) Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1. *Oncogene* 9: 405-415

Roy AL, Carruthers C, Gutjahr T, Roeder RG (1993) Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature* 365: 359-361

Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology* 132: 365-386

Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, Elble R, Watabe K, Mo YY (2009) p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 3207-3212

Salghetti SE, Muratani M, Wijnen H, Futcher B, Tansey WP (2000) Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 3118-3123

Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ (2007) MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer research* 67: 9762-9770

Sansom OJ, Meniel VS, Muncan V, Phesse TJ, Wilkins JA, Reed KR, Vass JK, Athineos D, Clevers H, Clarke AR (2007) Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 446: 676-679

Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Battle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS et al (2004) Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes & development* 18: 1385-1390

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495-505

Scheffner M, Kumar S (2014) Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects. *Biochimica et biophysica acta* 1843: 61-74

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136

Schlosser I, Holzel M, Hoffmann R, Burtscher H, Kohlhuber F, Schuhmacher M, Chapman R, Weidle UH, Eick D (2005) Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line. *Oncogene* 24: 520-524

Schlosser I, Holzel M, Murnseer M, Burtscher H, Weidle UH, Eick D (2003) A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic acids research* 31: 6148-6156

Schuhmacher M, Kohlhuber F, Holzel M, Kaiser C, Burtscher H, Jarsch M, Bornkamm GW, Laux G, Polack A, Weidle UH et al (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic acids research* 29: 397-406

Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J (1983) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305: 245-248

Schwab M, Ellison J, Busch M, Rosenau W, Varmus HE, Bishop JM (1984) Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 4940-4944

Schwamborn JC, Berezikov E, Knoblich JA (2009) The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* 136: 913-925

Sears R, Leone G, DeGregori J, Nevins JR (1999) Ras enhances Myc protein stability. *Molecular cell* 3: 169-179

Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & development* 14: 2501-2514

Seoane J, Le HV, Massague J (2002) Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419: 729-734

Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massague J (2001) TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nature cell biology* 3: 400-408

Shangary S, Wang S (2009) Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology* 49: 223-241

Shen M, Schmitt S, Buac D, Dou QP (2013) Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* 17: 1091-1108

Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV (1997) c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 6658-6663

Shrivastava A, Saleque S, Kalpana GV, Artandi S, Goff SP, Calame K (1993) Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science* 262: 1889-1892

Smith K, Dalton S (2010) Myc transcription factors: key regulators behind establishment and maintenance of pluripotency. *Regenerative medicine* 5: 947-959

Soucek L, Helmer-Citterich M, Sacco A, Jucker R, Cesareni G, Nasi S (1998) Design and properties of a Myc derivative that efficiently homodimerizes. *Oncogene* 17: 2463-2472

Soucek L, Jucker R, Panacchia L, Ricordy R, Tato F, Nasi S (2002) Omomyc, a potential Myc dominant negative, enhances Myc-induced apoptosis. *Cancer research* 62: 3507-3510

Soucek L, Nasi S, Evan GI (2004) Omomyc expression in skin prevents Myc-induced papillomatosis. *Cell death and differentiation* 11: 1038-1045

Soucek L, Whitfield JR, Sodik NM, Masso-Valles D, Serrano E, Karnezis AN, Swigart LB, Evan GI (2013) Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice. *Genes & development* 27: 504-513

Staller P, Peukert K, Kiermaier A, Seoane J, Lukas J, Karsunky H, Moroy T, Bartek J, Massague J, Hanel F et al (2001) Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nature cell biology* 3: 392-399

Sterz J, von Metzler I, Hahne JC, Lamottke B, Rademacher J, Heider U, Terpos E, Sezer O (2008) The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert opinion on investigational drugs* 17: 879-895

Stone J, de Lange T, Ramsay G, Jakobovits E, Bishop JM, Varmus H, Lee W (1987) Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Molecular and cellular biology* 7: 1697-1709

Stoneley M, Paulin FE, Le Quesne JP, Chappell SA, Willis AE (1998) C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* 16: 423-428

Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P (1982) Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 7837-7841

te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP (2002) DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer research* 62: 1876-1883

Ueno H, Kajiwarra Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, Maekawa K, Katsurada Y, Nakamura T, Mochizuki H et al (2012) New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *The American journal of surgical pathology* 36: 193-201

Uramoto H, Izumi H, Ise T, Tada M, Uchiumi T, Kuwano M, Yasumoto K, Funa K, Kohno K (2002) p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *The Journal of biological chemistry* 277: 31694-31702

van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP et al (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111: 241-250

Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C et al (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303: 844-848

Verdecia MA, Joazeiro CA, Wells NJ, Ferrer JL, Bowman ME, Hunter T, Noel JP (2003) Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Molecular cell* 11: 249-259

Vervoorts J, Luscher-Firzlaff J, Luscher B (2006) The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 281: 34725-34729

Vervoorts J, Luscher-Firzlaff JM, Rottmann S, Lilischkis R, Walsemann G, Dohmann K, Austen M, Luscher B (2003) Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO reports* 4: 484-490

Vita M, Henriksson M (2006) The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Seminars in cancer biology* 16: 318-330

von der Lehr N, Johansson S, Wu S, Bahram F, Castell A, Cetinkaya C, Hydbring P, Weidung I, Nakayama K, Nakayama KI et al (2003) The F-box protein Skp2 participates in c-

Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Molecular cell* 11: 1189-1200

Wall SB, Smith MR, Ricart K, Zhou F, Vayalil PK, Oh JY, Landar A (2014) Detection of electrophile-sensitive proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1840: 913-922

Walz S, Lorenzin L, Wiese KE, von Eyss B, Herold S, Rycak L, Dumay-Odelot H, Bartkuhn M, Roels F, Fischer M et al (2014) Oncogenic Myc levels activate and repress specific genes to form characteristic expression profiles in human tumors. *Nature letters*, in press

Wang H, Mannava S, Grachtchouk V, Zhuang D, Soengas MS, Gudkov AV, Prochownik EV, Nikiforov MA (2008) c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. *Oncogene* 27: 1905-1915

Wang X, Cunningham M, Zhang X, Tokarz S, Laraway B, Troxell M, Sears RC (2011) Phosphorylation regulates c-Myc's oncogenic activity in the mammary gland. *Cancer research* 71: 925-936

Warr MR, Acoca S, Liu Z, Germain M, Watson M, Blanchette M, Wing SS, Shore GC (2005) BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. *FEBS letters* 579: 5603-5608

Weber JD, Jeffers JR, Rehg JE, Randle DH, Lozano G, Roussel MF, Sherr CJ, Zambetti GP (2000) p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes & development* 14: 2358-2365

Welcker M, Orian A, Jin J, Grim JE, Harper JW, Eisenman RN, Clurman BE (2004) The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9085-9090

White BD, Chien AJ, Dawson DW (2012) Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 142: 219-232

Wiese KE, Walz S, von Eyss B, Wolf E, Athineos D, Sansom O, Eilers M (2013) The role of MIZ-1 in MYC-dependent tumorigenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3: a014290

Wolf E, Gebhardt A, Kawauchi D, Walz S, von Eyss B, Wagner N, Renninger C, Krohne G, Asan E, Roussel MF et al (2013) Miz1 is required to maintain autophagic flux. *Nature communications* 4: 2535

Wong DJ, Liu H, Ridky TW, Cassarino D, Segal E, Chang HY (2008) Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell stem cell* 2: 333-344

Wood MA, McMahon SB, Cole MD (2000) An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Molecular cell* 5: 321-330

Wu L, Grigoryan AV, Li Y, Hao B, Pagano M, Cardozo TJ (2012) Specific small molecule inhibitors of Skp2-mediated p27 degradation. *Chemistry & biology* 19: 1515-1524

Wu S, Cetinkaya C, Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, Eilers M, Leon J, Larsson LG (2003) Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* 22: 351-360

Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H, Ishida N, Okumura F, Nakayama K, Nakayama KI (2004) Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *The EMBO journal* 23: 2116-2125

Yang W, Shen J, Wu M, Arsura M, FitzGerald M, Suldan Z, Kim DW, Hofmann CS, Pianetti S, Romieu-Mourez R et al (2001) Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* 20: 1688-1702

Yang Y, Do H, Tian X, Zhang C, Liu X, Dada LA, Sznajder JI, Liu J (2010) E3 ubiquitin ligase Mule ubiquitinates Miz1 and is required for TNFalpha-induced JNK activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 13444-13449

Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn WC, Stukenberg PT, Shenolikar S, Uchida T et al (2004) A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nature cell biology* 6: 308-318

Yin X, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV (2003) Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function. *Oncogene* 22: 6151-6159

Yoon SY, Lee Y, Kim JH, Chung AS, Joo JH, Kim CN, Kim NS, Choe IS, Kim JW (2005) Over-expression of human UREB1 in colorectal cancer: HECT domain of human UREB1 inhibits the activity of tumor suppressor p53 protein. *Biochemical and biophysical research communications* 326: 7-17

Yu D, Cozma D, Park A, Thomas-Tikhonenko A (2005) Functional validation of genes implicated in lymphomagenesis: an in vivo selection assay using a Myc-induced B-cell tumor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1059: 145-159

Zeller KI, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV (2003) An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome biology* 4: R69

Zhang J, Kan S, Huang B, Hao Z, Mak TW, Zhong Q (2011a) Mule determines the apoptotic response to HDAC inhibitors by targeted ubiquitination and destruction of HDAC2. *Genes & development* 25: 2610-2618

Zhang K, Faiola F, Martinez E (2005) Six lysine residues on c-Myc are direct substrates for acetylation by p300. *Biochemical and biophysical research communications* 336: 274-280

Zhang X, Berger FG, Yang J, Lu X (2011b) USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1. *The EMBO journal* 30: 2177-2189

Zhao X, D DA, Lim WK, Brahmachary M, Carro MS, Ludwig T, Cardo CC, Guillemot F, Aldape K, Califano A et al (2009) The N-Myc-DLL3 cascade is suppressed by the ubiquitin ligase Huwe1 to inhibit proliferation and promote neurogenesis in the developing brain. *Developmental cell* 17: 210-221

Zhao X, Heng JI, Guardavaccaro D, Jiang R, Pagano M, Guillemot F, Iavarone A, Lasorella A (2008) The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. *Nature cell biology* 10: 643-653

Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2005) Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121: 1085-1095

Zhou X, Li TT, Feng X, Hsiang E, Xiong Y, Guan KL, Lei QY (2012) Targeted polyubiquitylation of RASSF1C by the Mule and SCFbeta-TrCP ligases in response to DNA damage. *The Biochemical journal* 441: 227-236

Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M (2004) Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer cell* 5: 455-463

Zimmerman KA, Yancopoulos GD, Collum RG, Smith RK, Kohl NE, Denis KA, Nau MM, Witte ON, Toran-Allerand D, Gee CE et al (1986) Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature* 319: 780-783

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
BR	basische Region
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
BTB/POZ	<i>bric-à-brac, tramtrack and broad complex/poxvirus and zinc finger</i>
C	Cystein
c	zenti
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ChIP-Seq	Chromatin-Immunpräzipitation mit Hochdurchsatz-Sequenzierung
CHX	Cycloheximid

CMV	Zytomegalievirus
Ct-Wert	<i>Cycle over threshold</i> ; Schwellenwert-Zyklus
D	Asparaginsäure
D	DMSO
Da	Dalton
DELFA	<i>dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat-Gemisch
DOC	Deoxycholsäure
Dox	Doxozyklin
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
eco	<i>ecotropic</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
env	<i>envelope protein</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FBS	fötales bovines Serum
FC	<i>fold change</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
G0-Phase	<i>Gap0</i> -Phase
G1-Phase	<i>Gap1</i> -Phase
G2-Phase	<i>Gap2</i> -Phase
gag	<i>group antigens</i>
GSEA	<i>gene set enrichment analysis</i>
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HAT	Histonacetyltransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IR	Intergenische Region
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i> ; interne ribosomale Eintrittsstelle
J	Joule
k	kilo
K	Lysin
Ktr	Kontrolle
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i> ; Nährmedium zur Bakterienkultur
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>

m	Meter
m	milli
M	molar
mES	murine embryonale Stammzellen
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
miR, miRNA	mikroRNA
M-MLV	Moloney Murines Leukämievirus
MoMuLV	Moloney Murines Leukämievirus
mono	monoklonal
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
MSigDB	<i>Molecular Signature Database</i>
N	DNA-Gehalt
n	nano
N	normal
n	Probenzahl
N	unbestimmte Base
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> ; nicht-essentielle Aminosäuren
NEM	N-Ethylmaleimid
NES	<i>normalized enrichment score</i>
NLS	nukleäres Lokalisierungssignal
NP-40	Nonidet P-40
NTA	Nitrilotriessigsäure
p-	Phospho-

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PEST	Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reiche Region
PI	Propidiumiodid
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
pol	DNA-Polymerase
poly	polyklonal
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
R	Arginin
rev	Reverse Transkriptase
RIPA	<i>radio immunprecipitation assay</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNA-Pol	RNA-Polymerase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RS	Retinolsäure
RSV	Rous Sarkomavirus
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
S	Serin
S	Svedberg

SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> ; Haarnadel-RNA
S-Phase	Synthese-Phase
SubG1	Zellen mit einem geringeren DNA-Gehalt als in der G1-Phase, apoptotische Zellen
T	Threonin
t _{1/2}	Halbwertszeit
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TNN	Tris-NaCl-NP-40
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	<i>units</i>
U	Uridin
Ub	Ubiquitin
Ubi	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	untranslatierte Region

UV	ultraviolett
V	Valin
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i> ; Volumen pro Volumeneinheit
VSV	vesikuläres Stomatitis-Virus
w/v	<i>weight/volume</i> ; Gewicht pro Volumeneinheit
WB	Western Blot
wt	Wildtyp

7.2 Publikationen

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel zur Veröffentlichung eingereicht:

Peter S, Bultinck J, Jaenicke LA, Walz S, Mueller J, Gmachl M, Treu M, Boehmelt G, Popov N, Kraut N, Eilers M (2014) Tumor cell-specific inhibition of MYC function using small molecule inhibitors of the HUWE1 ubiquitin ligase. EMBO molecular medicine, in Revision

7.3 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Prof. Dr. Martin Eilers für die wissenschaftliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft sowie die Förderung meines Projekts, durch die man auch in schwierigen Zeiten motiviert wurde.

Zusätzlich danke ich den weiteren Mitgliedern meines Thesis Committees, Prof. Dr. Dr. Manfred Schartl und Prof. Dr. Thorsten Stiewe, für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe Eilers, die einem immer mit wissenschaftlichem und technischem Rat zur Seite gestanden hat. Ich danke Renate für die unzähligen Male, bei denen sie mir bei der Arbeit assistiert hat. Vielen Dank vor allem an Steffi, Christina, Suse, Lisa und Anne für das Korrekturlesen dieser Arbeit und natürlich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung, ohne die die letzten Jahre nicht so viel Freude gemacht hätten. Danke Suse, auch wenn ich nicht auf deinem Paper stehe.

Zu guter Letzt möchte ich besonders meinen Eltern und Wolfram danken.

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation

„Hemmung der Myc-Funktion durch niedermolekulare Inhibitoren der E3-Ubiquitin-Ligase Huwe1“

eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift